

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. WOLFGANG BUCHALLA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BEEINFLUSSUNG DER WACHSTUMSFAKTORFREISETZUNG AUS
HUMANEM DENTIN DURCH SPÜLLÖSUNGEN UND MEDIKAMENTE IM
RAHMEN DER ENDODONTISCHEN BEHANDLUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mona Schiefersteiner

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. WOLFGANG BUCHALLA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BEEINFLUSSUNG DER WACHSTUMSFAKTORFREISETZUNG AUS
HUMANEM DENTIN DURCH SPÜLLÖSUNGEN UND MEDIKAMENTE IM
RAHMEN DER ENDODONTISCHEN BEHANDLUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mona Schiefersteiner

2016

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Kerstin Galler, Ph.D.
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Sebastian Hahnel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.03.2017

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Literaturübersicht.....	5
2.1	Pulpa-Dentin-Komplex	5
2.1.1	Dentin und seine Bestandteile.....	5
2.1.2	Dentinbildung während der Zahnentwicklung.....	6
2.1.3	Die Pulpa und ihr Regenerationspotenzial.....	6
2.1.4	Demineralisation des Dentins	8
2.2	Wachstumsfaktoren	9
2.2.1	Relevante Wachstumsfaktoren für die Pulparegeneration	10
2.2.2	Anwendung von Wachstumsfaktoren und ihre Problematik	10
2.3	Regenerative endodontische Therapiemaßnahmen	11
2.3.1	Erfolgskriterien	13
2.3.2	Behandlungsablauf.....	14
2.3.3	Problematik	15
2.3.4	Weitere Ansätze	15
2.4	Materialien in der Endodontie.....	16
2.4.1	Spüllösungen.....	17
2.4.1.1	Natriumhypochlorit.....	17
2.4.1.2	Chlorhexidin	18
2.4.1.3	Ethylendiamintetraacetat	18
2.4.1.4	Zitronensäure	19
2.4.2	Medikamente.....	19
2.4.2.1	Kalziumhydroxid	19
2.4.2.2	Ledermix-Paste	20
2.4.2.3	Triple-Antibiotika-Paste	20
2.4.2.4	Chlorhexidin-Gel	21
3	Fragestellung.....	22
4	Material und Methode.....	23
4.1	Versuchsvorbereitungen.....	23
4.1.1	Herstellung von Dentinscheiben	23
4.1.2	Spüllösungen.....	24
4.1.3	Medikamente.....	24
4.1.4	Labormaterialien und Geräte	25
4.2	Versuch 1: Demineralisation des Dentins zur Wachstumsfaktorfreisetzung	26

4.3	Versuch 2: Kombination von Spüllösungen.....	28
4.4	Versuch 3: Anwendung von Medikamenten.....	29
4.5	ELISA.....	31
4.6	Datenauswertung.....	32
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Versuch 1: Demineralisation des Dentins zur Wachstumsfaktorfreisetzung	33
5.2	Versuch 2: Kombination von Spüllösungen.....	34
5.3	Versuch 3: Anwendung von Medikamenten.....	36
6	Diskussion.....	39
6.1	Demineralisation des Dentins zur Wachstumsfaktorfreisetzung	39
6.1.1	Ergebnisse	39
6.1.2	Freilegung von Wachstumsfaktoren an der Dentinoberfläche.....	41
6.1.3	Bedeutung für regenerative endodontische Therapiemaßnahmen	41
6.2	Kombination von Spüllösungen	42
6.2.1	Ergebnisse	42
6.2.2	Natriumhypochlorit	43
6.2.3	Chlorhexidin	44
6.3	Anwendung von Medikamenten	45
6.3.1	Ergebnisse	45
6.3.2	Kalziumhydroxid	45
6.3.3	Triple-Antibiotika-Paste	46
7	Zusammenfassung	48
8	Literaturübersicht.....	50
9	Anhang.....	70
	Signifikanztabellen	70
	Abkürzungsverzeichnis.....	73
	Danksagung	75

1 Einleitung

Wurzelkanalbehandlungen sind aus dem zahnärztlichen Alltag nicht mehr wegzudenken. Wird eine irreversible Infektion oder Pulpanekrose diagnostiziert, die meist durch eine tiefe Karies oder durch ein Trauma verursacht wurde, stellt eine Wurzelkanalbehandlung einen Versuch dar den Zahn zu erhalten. Dabei wird infiziertes Pulpagewebe entfernt und das komplexe Wurzelkanalsystem mechanisch bearbeitet und mittels desinfizierender Spüllösungen und Medikamenten behandelt. Obwohl konventionelle Wurzelkanalbehandlungen im Allgemeinen eine sehr hohe Erfolgswahrscheinlichkeit haben, gibt es dennoch Fälle, bei denen sie an ihre Grenzen stoßen. Die Wurzelkanalbehandlung von Zähnen jugendlicher Patienten gestaltet sich aufgrund des nicht abgeschlossenen Wurzelwachstums mit weit offenem Apex und dünnen Dentinwänden schwierig. Daher wird bei diesen Zähnen eine modifizierte Wurzelkanalbehandlung durchgeführt: die Apexifikation. Durch diese Behandlung wird die Ausbildung einer Hartsubstanzbarriere im apikalen Bereich induziert, es kommt jedoch in der Regel nicht zum weiteren Wurzelwachstum und zur Stabilisierung des Zahnes. Um Komplikationen bei einem jungen Patienten zu vermeiden, wurde nach optimierten Behandlungsmöglichkeiten gesucht.

Alternativ zur Apexifikation kann mittlerweile die Revitalisierung durchgeführt werden, die auf einem regenerativen Ansatz beruht. Zahlreiche publizierte Fälle und Daten aus *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien liegen dazu vor (1, 2). Internationale Fachgesellschaften haben daher bereits Behandlungsempfehlungen zur Revitalisierung verfasst. Mit dieser Behandlungsmethode kann neben einer Symptom- und Entzündungsfreiheit auch die Bildung eines pulpaähnlichen Gewebes induziert werden, wodurch es zum Abschluss des Wurzelwachstums und somit zur Stabilisierung des betroffenen Zahnes kommen kann (3). Die Therapiemaßnahme, die im Zuge der Revitalisierung durchgeführt werden, basieren auf dem Wissen über die biologischen Prozesse bei der Zahnentstehung und der Geweberegeneration.

Zelluläre Reaktionen werden maßgeblich von Wachstumsfaktoren beeinflusst und daher sind diese auch im Rahmen von regenerativen endodontischen Therapiemaßnahmen essenziell. Während der Zahnentwicklung werden Wachstumsfaktoren in das Dentin sezerniert und dort an verschiedene Dentinbestandteile gebunden (4). Diese können durch Demineralisation wieder freigesetzt sowie reaktiviert werden.

Das Ziel dieser Studie war es ein Protokoll für eine optimale Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin zu etablieren, sowie den Einfluss von desinfizierenden Spüllösungen und Medikamenten auf dentingebundene Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Mit einer gezielten Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin könnten die Erfolgsaussichten für regenerative endodontische Therapiemaßnahmen optimiert werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Pulpa-Dentin-Komplex

2.1.1 Dentin und seine Bestandteile

Zähne bestehen aus Schmelz, Zement und Dentin, wobei Dentin den größten Anteil bildet. Als vitales Hartgewebe umgibt es die Pulpa und dient als Schutz vor externen pathologischen Reizen. Dentin wird von Odontoblasten gebildet, die ein organisches Grundgerüst in Form einer extrazellulären Matrix (Prädentin) sezernieren, welches anschließend durch einen Mineralisationsprozess (anorganische Komponente) zu reifem Dentin kalzifiziert (5, 6). Das Pulpacavum ist stets von einer Schicht Prädentin von etwa 10 bis 40 μm umgeben (5). Die organische Komponente des Dentins besteht zu etwa 90% aus Kollagen (7). Die restlichen 10% werden von nicht-kollagenen Proteinen (NCPs) gebildet (8). Mit NCPs ist eine große Vielzahl unterschiedlichster Proteine gemeint, unter anderem Proteoglykane, Phospholipide, Glykosaminoglykane sowie phosphorylierte Proteine. Phosphorylierte Proteine wie Bone Sialoprotein (BSP), Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1) oder Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) spielen eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Mineralisationsprozesses von Dentin (9–12). Im Dentin wurden ebenso zahlreiche Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor beta (TGF- β), Insulin-like Growth Factor (IGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Placenta Growth Factor (PlGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) (13–16) nachgewiesen. Außerdem befinden sich auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) im Dentin, die den Gewebeabbau sowohl physiologisch im Rahmen der Embryogenese, als auch bei pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen der Pulpa beeinflussen (17–21). Bioaktive Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, besitzen in aktiver Form eine sehr geringe Stabilität und Halbwertszeit. Durch eine Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix können sie vor Zerfall und proteolytischem Abbau geschützt werden. Im Dentin werden bioaktive Faktoren vorwiegend über eine glykosidische Bindung an Glykosaminoglykane oder an Proteoglykane gebunden (9, 10, 22). Weitere Möglichkeiten zur Anbindung sind durch spezifische Bindungsproteine (23), Glykoproteine wie Fibronektin (22) oder auch durch verschiedene Kollagentypen gegeben (24, 25).

2.1.2 Dentinbildung während der Zahnentwicklung

Die wechselseitige Beeinflussung durch eine molekulare Signalkaskade von epithelialen Zellen ektodermalen Ursprungs und mesenchymalen Zellen führt zur Entwicklung des Zahnes (26). Die Signalkaskade wird durch bioaktive Faktoren wie Wachstumsfaktoren gesteuert. An der späteren Schmelz-Dentin-Grenze bildet sich eine Basalmembran aus. Epitheliale Zellen, die mit dieser Basalmembran in Kontakt kommen, werden als Präodontoblasten bezeichnet und entwickeln sich zu reifen Odontoblasten weiter (27). Die übrigen epithelialen Zellen bleiben subodontoblastisch erhalten und können zu einem späteren Zeitpunkt zu Odontoblasten nachdifferenzieren (5). Verschiedene Studien zur Zahnentwicklung der Maus haben gezeigt, dass Wachstumsfaktoren wie Bone Morphogenic Protein (BMP-2, -4, -5, -7), FGF (FGF -3, -4, -8, -9) und TGF- β (TGF- β 1, 2, 3) maßgeblich an der Entstehung der Zähne beteiligt sind und in bestimmten Entwicklungsstadien von Odontoblasten exprimiert werden (4, 28, 29).

Sobald Odontoblasten eine Schicht Prädentin sezerniert haben, beginnt der Mineralisationsprozess. Dabei geben die Odontoblasten membrangebundene Granula (Matrixvesikel) ab, in denen sich neben hohen Konzentrationen von Kalzium und Phosphat auch verschiedenen Enzyme zur Initiierung und Regulierung des Mineralisationsprozesses wie MMPs befinden (7, 30). Während des Mineralisationsvorganges werden die Fortsätze der Odontoblasten (Tomes-Fasern) eingeschlossen, wodurch Dentintubuli entstehen (31). Diese ziehen durch die gesamte Dentinmatrix und bilden ein komplexes Hohlraumssystem, über welches eine Kommunikationsmöglichkeit zu Tomes-Fasern benachbarter Odontoblasten besteht (29, 32). Odontoblasten sind post-mitotische Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit verloren haben. Während die schmelzbildenden Zellen (Ameloblasten) nach Durchbruch des Zahnes in die Mundhöhle verloren gehen, können Odontoblasten zeitlebens Dentin bilden (33).

2.1.3 Die Pulpa und ihr Regenerationspotenzial

Die Pulpa besteht aus lockerem, spezialisiertem Bindegewebe mit einer Vielfalt an Zellen. Fibroblasten bilden die größte Zellpopulation, geben die Grundstruktur der Pulpa vor und modulieren die extrazelluläre Matrix (34). Durch Blutgefäße und ein Lymphsystem wird die Ernährung des Zahnes gesichert. Nervenfasern leiten Schmerzempfindungen und sensorische Stimuli des Pulpa-Dentin-Komplexes an das zentrale Nervensystem

weiter (35). Pathologischen Prozessen kann die Pulpa mit Abwehrmechanismen entgegenwirken. Bei einer tiefreichenden Karies dringen bakterielle Produkte wie Enzyme, Endotoxine oder Polysaccharide ein und verursachen eine initiale Entzündung in der Pulpa mit vaskulären und zellulären Reaktionen (32). Eine Hyperämie und eine gesteigerte Permeabilität der Blutgefäße führen zu einem erhöhten Gewebedruck, der in der Pulpa aufgrund der Kompensation durch das Lymphabflusssystem und angrenzende Blutgefäße anfangs lokal bleiben kann (32). Als zelluläre Reaktion werden initial neutrophile Granulozyten chemotaktisch angelockt und zu einem späteren Zeitpunkt auch weitere Immunzellen wie Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen (36). Durch deren zytotoxische Aktivität, Bildung von Zytokinen und auch die Freisetzung von toxischen und proteolytischen Enzymen bei deren Absterben kann die Immunantwort selbst Gewebeabbau begünstigen (29). Eine initiale Entzündung ist nach Beseitigung des Reizes vollständig reversibel. Hält der Reiz jedoch an und wird intensiver, können auch eingedrungene Bakterien durch Autolyse von Gewebe das Entzündungsgeschehen vorantreiben. Als weitere lokale Abwehrreaktion, kann die Pulpa durch die Bildung von Tertiärdentin eine größere Barriere zu eindringenden Pathogenen schaffen (37–39). Dabei wird zwischen Reiz- und Reparationsdentin unterschieden (40). Ein pathologischer Reiz führt auf molekularer Ebene durch Wachstumsfaktoren wie TGF- β und BMP zur Hochregulierung der sekretorischen Aktivität von Odontoblasten (41) und es entsteht schließlich Reizdentin. Überwiegt ein pathologischer Reiz, gehen lokal Odontoblasten unter. Durch deren Absterben wird eine Kaskade von zellulären Vorgängen ausgelöst, wie Chemotaxis, Zellmigration, -proliferation, -adhäsion und es erfolgt eine Differenzierung von pulpalen Stammzellen zu sekundären Odontoblasten, die dann das sogenannte Reparationsdentin sezernieren können (29). Überwiegt jedoch die Entzündungsreaktion kommt es schließlich zur Gewebsnekrose, die auf die gesamte Pulpa übergehen und selbst Gewebeverlust über den Apex hinaus bedeuten kann. Eine Nekrose der Pulpa kann aber auch durch Trauma oder starke mechanische und chemische Reize verursacht werden.

Die Bildung von Reparationsdentin zeigt, dass die Pulpa aufgrund lokaler Stammzellen über ein Regenerationspotenzial verfügt. Stammzellen besitzen die Fähigkeit zu proliferieren und sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Klinisch relevant sind nur adulte Stammzellen, die sich postnatal in verschiedenen Geweben des Körpers befinden und gegenüber embryonalen Stammzellen eine begrenztere Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit besitzen (42). Sie dienen einerseits als Ersatz beim

gewöhnlichen Zellumsatz, können aber im Falle einer Gewebeschädigung Regeneration induzieren. Sie sind nicht in der Lage Keimblatt-übergreifend zu differenzieren. Adulte Stammzellen können aus verschiedenen Geweben im Körper gewonnen werden. Ausschlaggebend für die Art der Differenzierung sind die Herkunft, das Entwicklungsstadium, das umgebende Milieu und die Beeinflussung durch bioaktive Faktoren (43–47).

Im Jahre 2000 konnten erstmals adulte Stammzellen in der Pulpa isoliert werden, die dentalen Pulpa-Stammzellen (DPSC) (48). Nachfolgend wurden noch weitere Stammzellen entdeckt: Stammzellen aus humanen Milchzähnen (SHED) (49), Stammzellen der apikalen Papille (SCAP) (50), Stammzellen des parodontalen Ligaments (PDLSC) (51) und Stammzellen des Zahnfollikels (DFSC) (52). Sie sind meist im perivaskulärem Gewebe anzutreffen und können allesamt in die verschiedenen Zelltypen der Pulpa differenzieren. Studien konnten zeigen, dass Stammzellen einer entzündeten Pulpa ihre Regenerationsfähigkeit vermutlich auch über einen längeren Zeitraum beibehalten können (53).

2.1.4 Demineralisation des Dentins

Verschiedene chemische Substanzen können zu einer Demineralisation und somit zum Verlust von Zahnhartsubstanz führen. Bei einer Demineralisation werden anorganische Bestandteile sukzessive herausgelöst und zurückbleibt das organische Grundgerüst. Sie kann durch einen veränderten pH-Wert während pathologischer Prozesse entstehen, wie durch die Bildung von Säuren bei einer Karies (54). Aber auch bei zahnärztlichen Therapiemaßnahmen werden alkalische und saure Substanzen sowie Komplexbildner zur Demineralisation genutzt. Schmelz wird allgemein bei einem pH-Wert von 5,2 bis 5,7 und Dentin bereits bei einem pH-Wert von 6,2 bis 6,7 angegriffen (55). Alkalische Substanzen wie Kalziumhydroxid $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ und Mineraltrioxidaggregat (MTA) werden bei einer direkten oder indirekten Überkappung der Pulpa zur Anregung von Tertiärdentinbildung verwendet und führen zu einer lokalen Demineralisation, die jedoch begrenzt ist (56, 57). Zur Vorbereitung der Zahnhartsubstanz für die Aufnahme von zahnärztlichem Komposit kommen Säuren zum Einsatz. Diese entfernen die Schmierschicht, welche durch Präparation des Dentins entstanden ist, und können somit einen guten adhäsiven Haftverbund zu Kompositen erzielen (58).

Auch im Bereich der Endodontie entsteht durch die mechanische Aufbereitung der Wurzelkanäle eine Schmierschicht. Sie weist eine Dicke von 1 bis 2 μm auf den Kanalwänden auf, kann aber bis zu 40 μm in die Dentintubuli hineingepresst sein und diese verblocken (59). Folglich können desinfizierende Spüllösungen nicht in tiefere Bereiche eindringen (60). Die Schmierschicht enthält Instrumentenabrieb, anorganische wie organische Dentinbestandteile, Pulpabestandteile sowie Mikroorganismen bei vorliegender Infektion (61, 62). Da sie auch als Nahrungsquelle für Mikroorganismen dienen kann, ist ihre Entfernung sinnvoll (63).

Bei einer Demineralisation von Zahnhartsubstanz wird auch eine Vielzahl an bioaktiven Faktoren wie Wachstumsfaktoren oder MMPs von deren Bindungsstellen im Dentin freigesetzt und reaktiviert (14, 15). Während MMPs von nachteiliger Wirkung sind, könnten Wachstumsfaktoren im Rahmen von regenerativen und reparativen Maßnahmen durch Modifikation zellulärer Reaktionen unterstützend wirken (54).

2.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind bioaktive Polypeptide, die ubiquitär im Körper auftreten. Sie spielen vor allem während der Embryonalentwicklung, aber auch postnatal eine essenzielle Rolle bei der Regulierung von Zellfunktionen. Sie beeinflussen bereits in sehr geringen Konzentrationen effektiv Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung, entscheiden aber auch über Apoptose oder Überleben von Zellen (64–67). Nach Bindung an membranständige Rezeptoren einer Zielzelle lösen sie eine intrazelluläre Signalkaskade aus und greifen schließlich im Zellkern in die Aktivierung oder Deaktivierung von Genen ein (68). Je nach Art der Zielzellen, des umgebenden Milieus und der Konzentration können Wachstumsfaktoren verschiedene Wirkungen hervorrufen. Es kann zwischen autogenen, xenogenen und rekombinanten Wachstumsfaktoren unterschieden werden. Autogene Wachstumsfaktoren stammen körpereigen vom jeweiligen Individuum ab. Xenogene Wachstumsfaktoren werden aus tierischem Gewebe gewonnen, wobei hier die Übertragungsgefahr von Krankheiten den klinischen Einsatz kritisch erscheinen lässt. Rekombinante Wachstumsfaktoren werden synthetisch mithilfe von Bakterien, hauptsächlich *Escherichia coli*, hergestellt (69). Durch chemische Verfahren werden die gewonnenen Wachstumsfaktoren für den klinischen Einsatz optimiert (68).

2.2.1 Relevante Wachstumsfaktoren für die Pulparegeneration

Es wurden bereits zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien in Tiermodellen mit dentalen Stammzellen durchgeführt, in welchen die Wirkungen von rekombinanten Wachstumsfaktoren mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen getestet wurden. Dentale Pulpastammzellen werden durch Wachstumsfaktoren zu Chemotaxis (70, 71) und Proliferation angeregt (72–74), aber auch Angiogenese (66, 75) und Mineralisationsprozesse werden gefördert (76, 77). Vor allem TGF- β 1 spielt eine essenzielle Rolle bei der Produktion und Bildung von extrazellulärer Matrix (78–80), Zellproliferation (74, 80, 81) und Differenzierung von Pulpastammzellen zu Odontoblasten (78, 81–83). Im Rahmen einer Pulpaüberkappung fördert es Zellmigration und -differenzierung sowie die Bildung von Tertiärdentin (74, 76). Als antiinflammatorischer Faktor induziert TGF- β 1 Kollagensynthese im Rahmen der Wundheilung (64, 69). FGF-2 und VEGF sind essenziell für die Angiogenese (84–87), begünstigen das Überleben von humanen Endothelzellen (88, 89) und erhöhen die Zellproliferation. Aber auch andere Wachstumsfaktoren wie BMP-2, BMP-7, IGF-1 oder PDGF fördern die relevanten Zellreaktionen für eine Pulparegeneration (90, 91).

2.2.2 Anwendung von Wachstumsfaktoren und ihre Problematik

Im klinischen Alltag kommen Wachstumsfaktoren bisher nur begrenzt zum Einsatz. Autogene Wachstumsfaktoren werden bei der Verwendung von Eigenblut durch thrombozytenreiches Plasma (platelet-rich plasma - PRP) mitgenutzt. In der Zahnheilkunde kann PRP beim Setzen von Implantaten und bei parodontalchirurgischen Eingriffen zum Einsatz kommen (69). Ein Anwendungsbeispiel eines rekombinanten Wachstumsfaktors ist PDGF, der in Form eines Gels zur therapeutischen Anwendung bei diabetischen Ulzera zugelassen ist (Regranex-Gel, Fa. Janssen-Cilag). Eine weitere mögliche Anwendung von autogenen oder rekombinanten Wachstumsfaktoren kann im Rahmen des Tissue Engineering erfolgen. Das Ziel des Tissue Engineerings ist die Reparatur, der Ersatz oder die Regeneration von Gewebe. Grundsätzlich beruht die Strategie auf dem Einsatz von Stammzellen, Wachstumsfaktoren und einem Trägermaterial (Scaffolds), das als Grundgerüst dient (92).

Für eine bedenkenlose Anwendung von rekombinanten Wachstumsfaktoren müssen noch einige Fragen geklärt werden, wie die Wahl der Kombination und Konzentration der Wachstumsfaktoren. Es darf zu keinen unerwünschten Wirkungen wie einer veränderten

Wechselwirkung mit humanen Zellen oder einer fragwürdigen Immunogenität kommen (93). Das Risiko maligner Gewebetransformationen muss ebenfalls ausgeschlossen werden, da Wachstumsfaktoren auch im Rahmen einer Tumorentstehung eine essenzielle Rolle bei Proliferation, Malignität und Metastasierung von Tumorzellen spielen (94, 95). Die klinische Anwendung von rekombinanten Wachstumsfaktoren ist außerdem durch eine geringe Stabilität sowie kurze Halbwertszeit der Moleküle und durch hohe Kosten des Produktionsaufwandes erschwert (96, 97). Aus diesen Gründen wäre die Verwendung von autogenen Wachstumsfaktoren zu bevorzugen.

2.3 Regenerative endodontische Therapiemaßnahmen

Konventionelle Wurzelkanalbehandlungen haben eine hohe Erfolgsrate von etwa 78 bis 98% (98–101). Verbleiben Bakterien im Wurzelkanalsystem oder erfolgt eine Reinfektion durch eine undichte Wurzelfüllung bzw. koronalen Verschluss wird die Erfolgsrate negativ beeinflusst (102). Auch ein apikales Entzündungsgeschehen vermindert die Erfolgswahrscheinlichkeit (103). Treten erneut Entzündungszeichen auf, so kann eine Revision der Wurzelfüllung mit erneuter Wurzelkanalbehandlung erfolgen oder es kommt sogar zur Extraktion des Zahnes. Wurzelkanalbehandlungen zeigen auch nachteilige Folgen wie eine Schwächung des Zahnes und eine Erhöhung des Frakturrisikos. Aufgrund der fehlenden Abwehr der Pulpa können wurzelkanalbehandelte Zähne auch ungestört durch Karies angegriffen werden (104). Zudem ist die Durchführung einer Wurzelkanalbehandlung techniksensitiv, da unter anderem eine Blockade der Kanäle, Instrumentenfraktur oder Perforation der Wurzeln zu einem Misserfolg und somit zum Verlust des Zahnes führen kann.

Ist bei jugendlichen Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum eine Wurzelkanalbehandlung aufgrund eines Traumas oder einer infizierten Pulpanekrose indiziert (105), gestaltet sich eine konventionelle Behandlung sehr schwierig, da durch die dünnen Wurzelwände ein hohes Frakturrisiko besteht und der weit geöffnete Apex keinen apikalen Stopp für eine Obturation zulässt (106). Um eine konventionelle Behandlung bei diesen Zähnen durchführen zu können, wird mit einer Apexifikation ein apikaler Stopp geschaffen. Heute wird dazu MTA in Kontakt mit dem umgebenden Gewebe gesetzt (107–109). Anschließend kann der Wurzelkanal konventionell abgefüllt und koronal verschlossen werden. Charakteristisch für MTA sind die Biokompatibilität und die Induktion zur Hartgewebsbildung. Dennoch kann es bei einer Apexifikation zu

keiner Zunahme der Wurzelwände in Länge und Dicke kommen, wodurch das Frakturrisiko der dünnen Dentinwände bestehen bleibt (110, 111). Alternativ gibt es die Möglichkeit der Extraktion des betroffenen Zahnes und der anschließenden Versorgung durch ein Implantat. Für einen jungen Patienten führt dies jedoch lokalisiert zu einer Veränderung des Kieferwachstums und kann somit ein ungünstiges ästhetisches Ergebnis bedeuten (112).

Da für den Abschluss des Wurzelwachstums die Vitalität des Pulpa-Dentin-Komplexes beim jugendlichen Patienten unabdingbar ist (113), existiert auch bereits eine alternative Behandlungsmethode: die Revitalisierung. Die Revitalisierung ist als ein regenerativer Ansatz biologisch basiert und soll neben einer Schmerz- und Entzündungsfreiheit zum Abschluss des Wurzelwachstums sowie zur Regeneration der Pulpa mit all ihren Funktionen führen (114–117). Während im europäischen Sprachraum bei dieser Behandlung von der Revitalisierung gesprochen wird, gilt im Englischen der Begriff der regenerativen endodontischen Therapie (Regenerativ Endodontic Procedures - REP) als Synonym.

Bereits 1961 wurde der Grundstein für diese Therapie mittels Tierversuche gelegt. Dabei wurde eine Einblutung in den Wurzelkanal aus dem apikalen Gewebe provoziert, was jedoch meist zur Bildung von fibrösem sowie granulierendem Gewebe oder zu Resorptionsvorgängen geführt hatte (118, 119). Die Grundidee, mittels einer Einblutung Stammzellen aus dem apikalen Gewebe in den Wurzelkanal einzuschwemmen (43, 120) und dadurch eine Revitalisierung zu bewirken, wurde weiter optimiert und heute finden sich zahlreiche erfolgreiche Fallbeispiele von revitalisierten jugendlichen Zähnen. Da jedoch weitgehend standardisierte Behandlungsvorgehensweisen gefehlt haben, hat die American Association of Endodontists (AAE) im Jahr 2013 auf Basis von publizierten Fällen ein Behandlungsprotokoll etabliert, welches 2016 nochmals aktualisiert wurde. 2016 hat auch die European Society of Endodontology (ESE) zur Revitalisierung eine Stellungnahme publiziert. Als geeignet für eine Revitalisierung erscheinen Zähne mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum nach Trauma, pulpalen Infektionen im Rahmen von Entwicklungsabweichungen oder Pulpanekrosen und periradikuläre Läsionen bedingt durch Karies. Je weiter offen der Apex des Zahnes ist, desto wahrscheinlicher kommt es zu einem Einwachsen von neuen Blutgefäßen und zu einer Gewebeneubildung (121).

2.3.1 Erfolgskriterien

In einer Studie von *Diogenes et al.* werden die Erfolgskriterien einer Revitalisierung anhand verschiedener Gesichtspunkte aufgegliedert (122). Für den Patienten stehen die Schmerzfreiheit, das Fehlen von Entzündungszeichen sowie der Erhalt des Zahnes im Vordergrund. Ein weiterer Aspekt des Patienten betrifft die Ästhetik. In manchen Fällen einer Revitalisierung ist es zu unerwünschten Verfärbungen des Zahnes gekommen. Grund hierfür war die Verwendung des Antibiotikums Minozyklin, welches in der Triple-Antibiotika-Paste enthalten war, eine Ablagerung von Blutbestandteilen in den Dentintubuli oder die Verwendung von MTA (123, 124).

Aus Sicht des Behandlers ist, neben einer klinischen Symptommfreiheit, der Erfolg einer Revitalisierung röntgenologisch zu messen. Dabei steht die röntgenologische Ausheilung einer apikalen Osteolyse im Vordergrund. Zudem kann eine Zunahme des Wurzelwachstums in Länge und Dicke kontrolliert werden. In mehr als 90% der publizierten Fälle einer Revitalisierung ist es zu einer Ausheilung der periapikalen Läsion gekommen (125). Die Vorhersehbarkeit des Wurzelwachstums ist jedoch weitaus schwieriger prognostizierbar. Zur Beurteilung einer Revitalisierung ist auch die Testung der Pulpa-Sensibilität relevant. Ein positives Resultat durch Kälte oder einen elektrischen Reiz kommt in ungefähr 60% der publizierten Fälle vor (126) und könnte die Entstehung eines pulpaähnlichen, vaskularisierten und innervierten Gewebes bedeuten (127). Fraglich ist weiterhin ob Faktoren wie Zahntyp, Ätiologie, Geschlecht oder Alter des Patienten die Erfolgsaussichten beeinflussen (125, 128).

Aus Sicht der Wissenschaft ist die Art des neu gebildeten Gewebes interessant. Dazu wurden Zähne nach erfolgter Revitalisierung, die aufgrund eines Traumas oder einer Fraktur extrahiert werden mussten, histologisch untersucht. Das neu gebildete Gewebe zeigte Unterschiede zur physiologischen Pulpa bezüglich der Odontoblasten (129). Folglich wird eher eine Reparatur als eine echte Regeneration der Pulpa vermutet (130). Dennoch soll das Ziel einer Revitalisierung ein Gewebe sein, das möglichst alle Funktionen einer physiologischen Pulpa übernimmt.

Als Misserfolg einer Revitalisierung wird eine Reinfektion des Wurzelkanals (131), das Ausbleiben des Wurzelwachstums oder eine partielle Obliteration des Wurzelkanals durch eine überschießende Mineralisation gewertet (1, 115, 128). Wurzelresorption, Ankylose oder Verfärbung des Zahnes sind ebenfalls unerwünscht. Zur Überprüfung des Behandlungserfolges sollen ausreichend klinische und röntgenologische Kontrollen

durchgeführt werden, wobei dazu noch konkrete standardisierte Empfehlungen fehlen (128). Die Anzahl und Abstände der Nachkontrollen sollten individuell festgelegt werden und bei komplexen Fällen mit ausgeprägten Entzündungen engmaschig sein. Zu beachten ist, dass selbst nach einem Misserfolg Behandlungsalternativen wie Apexifikation, konventionelle Wurzelkanalbehandlung und Extraktion des Zahnes bestehen bleiben.

2.3.2 Behandlungsablauf

Die AAE empfiehlt nach einer ausführlichen Anamnese, Befunderhebung und klinischer sowie röntgenologischer Diagnostik die Aufklärung des jungen Patienten und dessen Eltern (132). Nach Einwilligung erfolgt in der ersten Sitzung nach Anästhesie und Isolierung des Arbeitsfeldes mit Kofferdam die Trepanation des betroffenen Zahnes. Der Wurzelkanal soll mit 20 mL 1,5%igem Natriumhypochlorit (NaOCl) für 5 Minuten und anschließend mit 20 mL Kochsalzlösung (NaCl) oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA) pro Kanal für 5 Minuten gespült werden. Nach einer Trocknung erfolgt eine medikamentöse Einlage mit Kalziumhydroxid. Bei Fällen mit ausgeprägten Entzündungen kann die Anwendung einer Triple-Antibiotika-Paste erwogen werden. Nach einem provisorischen Verschluss des Zahnes soll der Patient nach ein bis vier Wochen zur Weiterbehandlung einbestellt werden. Besteht zum Zeitpunkt der zweiten Sitzung keine Symptomatik mehr, kann nach einer Anästhesie (ohne Zusatz eines Vasokonstriktors) und Isolierung des Arbeitsfeldes die Retrepanation des Zahnes erfolgen. Der Wurzelkanal soll mit 20 mL EDTA 17% für 5 Minuten gespült und anschließend getrocknet werden. Mit einer umgebogenen Spitze einer gebräuchlichen endodontischen Feile soll durch Überinstrumentierung eine Einblutung in den Wurzelkanal provoziert werden, bis der Wurzelkanal mit Blut aus der periapikalen Region gefüllt ist. Dabei soll ausreichend Platz von 3 bis 4 mm für einen koronalen Verschluss des Zahnes mit Komposit bestehen bleiben. Auf das gebildete Blutkoagel soll eine Kollagenmatrix und anschließend MTA aufgebracht werden (128). MTA kann zu einer Verfärbung des Zahnes führen und daher sollte im ästhetischen Bereich besser ein alternatives Material wie Biodentine® (Septodont) verwendet werden (133).

Die ESE weist in ihren publizierten Richtlinien ein ähnliches Behandlungsvorgehen auf (134). In der ersten Sitzung wird jedoch nach einer Desinfektion mit NaOCl (1,5 bis 3%) ein Spülen mit NaCl (5 mL) empfohlen, um zytotoxische Effekte des NaOCl zu neutralisieren. Anschließend soll das Dentin mit 17% EDTA konditioniert werden. Als

medikamentöse Einlage wird ebenfalls Kalziumhydroxid empfohlen. In der zweiten Sitzung soll der Wurzelkanal nach einer Konditionierung mit EDTA mit NaCl gespült werden.

Eine mechanische Bearbeitung der dünnen Dentinwände wird grundsätzlich nicht empfohlen, da sie geschwächt und auch vitales Restgewebe entfernt werden könnten (106, 117).

2.3.3 Problematik

Die Revitalisierung wird als Alternative zur Apexifikation in der Literatur kontrovers diskutiert, jedoch fehlen Langzeitdaten für eine konkrete Aussage der Überlebensfähigkeit dieser Zähne (125, 128). Ein weiteres Problem stellt die Fallauswahl dar, da meist noch die konventionelle Behandlung bevorzugt wird und nur sehr komplexe Fälle regenerativ behandelt werden, was die Erfolgsaussichten beeinträchtigen könnte. Fraglich ist weiterhin ob es nur zu einer Reparatur mit ektopischem Gewebe kommt oder ob tatsächlich ein pulpaähnliches Gewebe gebildet wird. Für den Patienten sind jedoch in erster Linie eine Symptom- und Entzündungsfreiheit sowie eine Weiterbildung der Wurzel relevant. Ist nach einer Revitalisierung eine kieferorthopädische Behandlung indiziert, so muss beachtet werden, dass revitalisierte Zähne für Entzündungsreaktionen und Wurzelresorptionen anfälliger sein können (135). Revitalisierte Zähne sollten daher nicht oder nur unter engmaschigen Kontrollen reguliert werden.

2.3.4 Weitere Ansätze

Für eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit von regenerativen endodontischen Therapiemaßnahmen könnte die Anwendung des Tissue Engineering von Vorteil sein. Auch im Bereich der Zahnheilkunde gibt es bereits zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Versuche zur Geweberegeneration auf Basis des Tissue Engineering. Es konnte gezeigt werden, dass dentale Stammzellen, die gemeinsam mit einem Trägermaterial und Wachstumsfaktoren in einen Dentinzyylinder in immunsupprimierte Mäuse implantiert wurden (43, 136), einen Pulpa-Dentin-Komplex ausbilden (48, 137, 138) und differenzierte sekundäre Odontoblasten eine dentinähnliche Struktur sezernieren können (48, 139, 140). Obwohl Studien vielversprechende Ergebnisse geliefert haben, gestaltet sich die klinische Anwendung durch die Beschaffung von Stammzellen schwierig (43).

Eine Entnahme von dentalen Stammzellen könnte im Rahmen der Exfoliation oder der Weisheitszahnentfernung erfolgen. Die Aufbereitung, Kultivierung und Lagerung der Zellen stellt jedoch eine aufwendige und kostenintensive Arbeit dar, die in zahnärztlichen Praxen nicht durchführbar wäre (43, 92).

Zur Vermeidung einer Stammzellenentnahme könnte eine alternative primär zellfreie Pulparegeneration durch die Migration von Stammzellen aus der periapikalen Region nach dem Prinzip des „Cell-Homing“ erfolgen. Dabei wäre die Inkorporation eines geeigneten Trägermaterials mit Wachstumsfaktoren in den Wurzelkanal denkbar, wodurch lokale Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung sowie zur Bildung eines dreidimensionalen, pulpaähnlichen Gewebes angeregt werden könnten (141). Das Trägermaterial muss dabei leicht zu applizieren sein, eine lockere Struktur für eine Vaskularisation und Innervation aufweisen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren binden und freisetzen können sowie Bildung und Mineralisation von Hartgewebe zulassen. Bedenkt man nun, dass im Dentin verschiedene autogene Wachstumsfaktoren eingeschlossen sind, könnte auch auf den Einsatz von rekombinanten Wachstumsfaktoren verzichtet werden. (142). Vorstellbar wäre beispielsweise, dass durch eine geeignete Vorbehandlung des Dentins Wachstumsfaktoren in Lösung übergehen, welche zusammen mit einem Trägermaterial zurück in den Wurzelkanal gesetzt werden könnte (141).

2.4 Materialien in der Endodontie

Der Schlüsselfaktor für eine erfolgreiche endodontische Behandlung eines Zahnes ist die Desinfektion des komplexen Wurzelkanalsystems. Dazu erfolgt bei der konventionellen Therapie eine chemo-mechanische Aufbereitung der Wurzelkanäle. Mit endodontischen Feilen wird der Wurzelkanal erweitert, um Gewebe zu entfernen, eine Anwendung von desinfizierenden und gewebsauflösenden Spüllösungen zu ermöglichen und den Wurzelkanal für eine anschließende Obturation vorzubereiten (29). Um weitgehende Keimfreiheit zu erzielen und folglich einen symptomlosen Zahn zu erhalten, sind oft mehrere Sitzungen erforderlich. Zwischen den Sitzungen werden daher medikamentöse Einlagen in den Wurzelkanal eingebracht (143). Die Ziele der chemischen Wurzelkanalbehandlung sind die Eliminierung von Mikroorganismen und die Denaturierung von restlichem Pulpagewebe, auch in mechanisch nicht erreichbaren Arealen des Wurzelkanalsystems. Zudem sollen bakterielle Bestandteile, wie

Lipopolysaccharide (LPS) und Toxine, inaktiviert werden, da sie als proinflammatorische Mediatoren Entzündungsreaktionen, Gewebszerstörung und periapikale Osteolyse bewirken können (144–146). Die desinfizierende Wirkung von Spüllösungen und Medikamenten beruht auf Proteinschädigung, Permeabilitätsstörung der Zellmembran oder einer Blockade von Enzymsystemen (147). Eine Herausforderung besteht in der Schonung von unmittelbar benachbartem, vitalem Gewebe (148). Folglich sollen Spüllösungen eine geringe Toxizität aufweisen, biologisch gut verträglich sein und die instrumentelle Aufbereitung erleichtern (149).

Die Problematik der Keimreduktion im Wurzelkanalsystem besteht in der Ausbildung eines bakteriellen Biofilms, wodurch die Bakterien schwieriger anzugreifen sind. Die Wirkung von desinfizierenden Lösungen und Medikamenten wird zudem durch Gewebereste, Blutbestandteile, Pus und durch Dentin selbst inhibiert (149–151). Zur Optimierung der Spülwirkung ist häufiges Spülen mit genügend langer Einwirkzeit erforderlich. Zudem muss berücksichtigt werden, dass sich verschiedene Spüllösungen gegenseitig neutralisieren oder unerwünschte Reaktionen hervorrufen können (152).

2.4.1 Spüllösungen

Folgende gebräuchliche Spüllösungen wurden in dieser Arbeit getestet und werden daher genauer erläutert: Natriumhypochlorit, Chlorhexidin, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Zitronensäure.

2.4.1.1 Natriumhypochlorit

Die klinische Anwendung von Natriumhypochlorit (NaOCl) erfolgt heute in Konzentrationen von 0,5 bis 5,25% (29). Neben einer sehr guten antimikrobiellen Eigenschaft werden auch bakterielle Bestandteile und Toxine zerstört (153). Die antimikrobielle Wirkung ist unabhängig von der verwendeten Konzentration, wobei höhere Konzentrationen eine Dekontamination schneller erreichen (154) und einen bakteriellen Biofilm besser zerschlagen können (155). NaOCl kann als einzige gebräuchliche Spüllösung vitales und nekrotisches Gewebe auflösen und somit auch organische Anteile der Dentinstruktur denaturieren (156). Höhere Konzentrationen von NaOCl bewirken eine schnellere Gewebeauflösung (157–159), jedoch nimmt mit steigender Konzentration die Zytotoxizität zu (160). Durch die Anwendung von NaOCl werden die Härte, die Biegefestigkeit und das E-Modul von Dentin verringert und es

können Erosionen sowie erhöhte Permeabilität auftreten (161–163). Wird NaOCl über den Apex hinaus gepresst, kann es Nekrosen und Emphyseme im Gewebe mit starken Schmerzen und Parästhesien verursachen (164). Eine Konzentration von 1,5 bis 3% erscheint als gute Lösung bei Abwägung der Vor- und Nachteile der Anwendung von NaOCl (134, 165, 166).

2.4.1.2 Chlorhexidin

Chlorhexidin (CHX) wird in der Zahnmedizin meist als Chlorhexidindigluconat in einer Konzentration von 0,2 bis 2% verwendet. In wässriger Lösung ist CHX positiv geladen und kann sich somit an negativ geladenen Zellwandstrukturen von Bakterien binden und sie durchlässig machen. CHX wirkt in geringen Konzentrationen bakteriostatisch und in hohen Konzentrationen durch eine Präzipitation oder Koagulation des Zytoplasmas von Bakterienzellen bakterizid (167). CHX deckt ein breites antimikrobielles Spektrum ab, jedoch wirkt es bei grampositiven Bakterien besser als bei gramnegativen (149, 168). Es zeigt auch gute Wirkung gegen das grampositive Bakterium *Enterococcus faecalis* sowie gegen Fungi wie *Candida albicans*, welche beide eine Herausforderung bei Revisionsfällen darstellen (152, 169, 170). Aufgrund der anionischen Phosphatgruppen des Hydroxylapatits kann CHX auch an Dentin binden und selbst nach Trocknung über einen längeren Zeitraum desinfizierend wirken (171–173), wobei die Dauer der Wirkung konzentrationsabhängig ist (173). Diese Eigenschaft wird als Substantivität bezeichnet. Dadurch eignet sich CHX auch als temporäre intrakanaläre Einlage oder zur finalen Spülung bei Revisionsfällen (166, 174). Im Vergleich zu NaOCl zeigt CHX eine bessere Bioverträglichkeit (175, 176), eine geringere Toxizität und kaum Beeinflussung der Dentinstruktur (177, 178). CHX fehlt jedoch die Fähigkeit, Gewebe aufzulösen, bakterielle Bestandteile und Toxine zu neutralisieren, die Schmierschicht zu entfernen sowie einen polymikrobiellen Biofilm zu zerstören (155).

2.4.1.3 Ethylendiamintetraacetat

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ist ein negativ geladenes Molekül, das als Komplexbildner die Fähigkeit besitzt, durch sechs Bindungsstellen ein positiv geladenes Ion zu binden. Dadurch können Kalziumionen aus den Hydroxylapatitkristallen herausgelöst und das Dentin demineralisiert werden. EDTA wird in der Endodontie eingesetzt um die Schmierschicht zu entfernen, Dentintubuli freizulegen und einen bakteriellen Biofilm abzulösen (166). EDTA führt jedoch konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Dentinhärte und zu einer erhöhten

Dentinpermeabilität (179–181). Es greift die oberflächlichen 20 bis 30 µm des Dentins an (182), wobei die Eindringtiefe auch bei einer Einwirkzeit von mehr als 24 Stunden auf 50 µm begrenzt ist (183). EDTA besitzt nur eine sehr geringe antimikrobielle Eigenschaft (179). Wird es ins periapikale Gewebe überpresst, zeigt es zytotoxische Wirkungen, bewirkt Gewebeirritationen (184, 185) und führt zu einer Beeinflussung der Funktion von Makrophagen, wodurch eine veränderte Entzündungsreaktion entstehen kann (186, 187). EDTA kann außerdem MMPs inaktivieren, da es Kalzium und Zink bindet, die für eine optimale Funktion von MMPs notwendig sind (183, 188, 189). Bei der Anwendung von EDTA ist ferner zu beachten, dass es die Wirkung von NaOCl aufhebt (190), wohingegen EDTA nicht eingeschränkt wird, zumindest nicht in der klinisch relevanten Zeit (191).

2.4.1.4 Zitronensäure

Zitronensäure wird alternativ zur Entfernung der Schmierschicht in Konzentrationen von 10 bis 15% verwendet und wirkt sowohl durch den niedrigen pH-Wert als auch durch eine komplexierende Eigenschaft demineralisierend (192). Verglichen mit 17%igem EDTA führt Zitronensäure zu einer stärkeren Demineralisation und ist sogar mit Konzentrationen bis zu 25% weniger zytotoxisch (193, 194). Zudem besitzt sie eine geringe antimikrobielle Wirkung. Bei der Anwendung ist zu beachten, dass Zitronensäure die Wirkung von NaOCl durch eine Reduktion von Chlor herabsetzen kann.

2.4.2 Medikamente

Folgende gebräuchliche intrakanaläre Medikamente wurden in dieser Arbeit getestet und werden daher genauer erläutert: Kalziumhydroxid, Ledermix-Paste, Triple-Antibiotika-Paste und Chlorhexidin-Gel.

2.4.2.1 Kalziumhydroxid

Kalziumhydroxid $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ ist bei endodontischen Behandlungen das Mittel der Wahl. Es zeichnet sich durch eine gute antimikrobielle Wirkung aus, welche aus dem hohen pH-Wert von 12,5 und einer ständigen Abgabe von Hydroxylionen resultiert (195). Kalziumhydroxid führt zu einer Zerstörung der zytoplasmatischen Membran von Mikroorganismen (29), Denaturierung von proinflammatorischen Zytokinen und Neuropeptiden (196) sowie zu einer Inaktivierung von LPS (197, 198). Es zeigt sich gegenüber anaeroben Bakterien wirksam (199) und löst auch nekrotisches Gewebe auf (200). Die Problemkeime *Enterococcus faecalis* und *Candida albicans* gelten jedoch als

resistent (152, 201). Kalziumhydroxid hemmt zudem die Funktion von Makrophagen, wodurch die Entzündung im periapikalen Gewebe eingedämmt werden kann (202). Es wird zur direkten und indirekten Pulpaüberkappung, zur Pulpotomie bei Milchzähnen und früher auch zur Apexifikation eingesetzt (203, 204). Kalziumhydroxid wird als medikamentöse Einlage in der regenerativen Endodontie empfohlen, da es nicht zytotoxisch auf Stammzellen der apikalen Papille wirkt (205). Der alkalische Charakter wirkt sich jedoch nachteilig aus, da Karboxylat- und Phosphatgruppen des Hydroxylapatits gespalten sowie Proteine neutralisiert und denaturiert werden können. Folglich wird das Dentin geschwächt und die Frakturanfälligkeit erhöht (106), was sich gerade bei einer längeren Einwirkzeit deutlich zeigt (206). Kalziumhydroxid kann in Form von wässrigen Lösungen oder Pasten verwendet werden. In Pulverform wird es mit Wasser, CHX oder in einer ölhaltigen Suspension angerührt.

2.4.2.2 Ledermix-Paste

Ledermix ist eine gelbliche Paste, die ein Glukokortikoid (Triamcinolon) und als Antibiotikum ein Tetrazyklinderivat (Demeclocyclin) enthält. Demeclocyclin wirkt effektiv gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Ledermix zeichnet sich durch einen initial schnellen Wirkungseintritt sowie durch eine langsame und beständige Freisetzung der aktiven Komponenten aus (207, 208). Es besitzt die Fähigkeit durch Dentintubuli zu diffundieren, was zu einer besseren Wirkung des Medikaments führt (207). Ledermix wird als Notfallmedikament bei einer akuten Pulpitis oder einer infizierten Nekrose eingesetzt. Zusätzlich kann es als Pulpitisprophylaxe nach Kavitäten- und Stumpfpräparationen dienen (209). Studien haben gezeigt, dass Ledermix die postendodontische Schmerzempfindung nach Behandlung einer akuten, irreversiblen Pulpitis oder einer apikalen Parodontitis reduziert (210, 211). Bei der Anwendung besteht allerdings das Risiko einer allergischen Reaktion durch das enthaltene Demeclocyclin und Natriumsulfit sowie einer Antibiotikaresistenz (212). Zudem kann Ledermix zu Zahnverfärbungen führen.

2.4.2.3 Triple-Antibiotika-Paste

Triple-Antibiotika-Paste (TAP) besteht aus einer Kombination dreier verschiedener Antibiotika. Es enthält Ciprofloxacin, Metronidazol und Minozyklin. Die Anmischung von antibiotischem Pulver erfolgt bevorzugt mit Propylenglykol, wodurch eine tiefere Penetration in das Dentin erreicht wird (213). TAP ist wirkungsvoll gegenüber den Bakterien, die im infizierten Wurzelkanal gefunden werden und wurde anfangs bei

Milchzähnen verwendet. Heute kommt TAP auch häufig bei einer Revitalisierung zum Einsatz (126, 214, 215) und kann auch bei großen periapikalen Läsionen wirkungsvoll sein (216). Aufgrund möglicher allergischer Reaktionen und Zahnverfärbungen durch Minozyklin wurde dieses durch Cefuroxim ersetzt (217–219) oder es wird nur als Double-Antibiotika-Paste (DAP) verwendet. TAP findet meist in einer sehr hohen Dosierung Verwendung und wirkt dadurch stark zytotoxisch (205). Ist die Anwendung von TAP indiziert, wird heute eine 100-fach geringere Konzentration (0,1 bis 1 mg/mL) als in der Originalanwendung empfohlen (205). Das Risiko einer Antibiotikaresistenz bzw. Sensibilisierung des jugendlichen Patienten ist zu bedenken und darf nicht vernachlässigt werden. TAP führt außerdem zu einer verringerten Mikrohärtigkeit von Dentin und kann das Risiko einer Wurzelfraktur erhöhen (220).

2.4.2.4 Chlorhexidin-Gel

Der Wirkstoff Chlorhexidin wurde bereits in 2.4.1.2 erläutert. Chlorhexidin-Gel (CHX-Gel) wird zur besseren Heilung bei Gingivitis, Entzündungen der Mundschleimhaut, nach parodontalchirurgischen Eingriffen und bei eingeschränkter Mundhygienefähigkeit eingesetzt (221). Auch gelförmig zeigt es bei intrakanalärer Anwendung eine gute antimikrobielle Wirkung (222).

3 Fragestellung

Im Bereich der regenerativen Endodontie könnte Dentin mit seinen Bestandteilen als ein Reservoir an körpereigenen, bioaktiven Faktoren dienen. Durch Demineralisation des Dentins können diese Wachstumsfaktoren herausgelöst, reaktiviert und möglicherweise unterstützend bei einer Revitalisierung der Pulpa wirken. Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration ist eine weitgehende Keimfreiheit des Wurzelkanalsystems. Die dabei verwendeten desinfizierenden Materialien könnten sich jedoch auch auf die Wachstumsfaktorfreisetzung auswirken.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden für diese Arbeit folgende Ziele gesetzt:

1. Etablierung eines optimierten Protokolls zur Demineralisation des Dentins
2. Quantifizierung des freigesetzten Wachstumsfaktors TGF- β 1
3. Untersuchung des Einflusses von endodontischen Spüllösungen auf die Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin
4. Untersuchung des Einflusses von Medikamenten zur Einlage im Wurzelkanal auf die Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin

4 Material und Methode

4.1 Versuchsvorbereitungen

Vor jedem Versuchsbeginn wurden alle benötigten Materialien und Lösungen hergestellt und vorbereitet. Die Versuchsdurchführung erfolgte stets unter hygienischen Bedingungen.

4.1.1 Herstellung von Dentinscheiben

Für die Versuche wurde die erforderliche Anzahl an Dentinscheiben mit einer Dicke von 200 μm und einem Durchmesser von 8 mm aus menschlichen Molaren hergestellt. Besonderes Augenmerk galt dabei der Kariesfreiheit der Zähne und einer möglichst großen Zahnkrone. Die technische Herstellung der Dentinscheiben wird im Folgenden beschrieben.

Die Molaren wurden direkt nach der Extraktion in 0,5%iger Chloramin T-Lösung im Kühlschrank bei 6° C gelagert. Zur Bearbeitung wurde anhaftendes Weich- und Hartgewebe des Parodonts vorsichtig mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurden die Zähne mit dem Autopolymerisat PalaDur möglichst senkrecht auf Objektträgern fixiert. Die Molaren wurden bei konstanter Wasserkühlung mit einem Innenlochsägemikrotom (600 min^{-1} , 300 μm Sägeblattstärke) in 200 μm dicke Scheiben geschnitten. Die gewonnenen Zahnscheiben sollten eine möglichst große Fläche an Dentin aufweisen, ohne Einbrüche zur Pulpa oder Schmelzbeteiligung. Dabei konnten aus jedem Zahn meist bis zu drei brauchbare Zahnscheiben geschnitten werden. Diese wurden anschließend gestanzt, um Dentinscheiben mit einem standardisierten Durchmesser von 8 mm zu erhalten. Die Lagerung erfolgte bis zum Versuchsbeginn in 48-Multiwell-Platten in 500 μl Chloramin T im Kühlschrank bei 6° C.

24 Stunden vor Gebrauch wurden alle benötigten Dentinscheiben in neue Wells einer 48-Multiwell-Platte mit jeweils 500 μl bidestilliertem H_2O überführt und im Kühlschrank gelagert. Überschüssige Flüssigkeit wurde zuvor mit Zellstoff entfernt.

Für jeden Versuchsdurchgang wurden neun Dentinscheiben pro Versuchsgruppe benötigt. Dadurch ergaben sich Triplikate der drei verschiedenen Einwirkzeiten von 5, 10

und 20 Minuten. Alle Versuche wurden in unabhängigen Experimenten zweimal wiederholt.

4.1.2 Spüllösungen

Folgende Spüllösungen wurden für die Versuche verwendet:

- Chlorhexidin (Gum Paroex, Chlorhexidingluconat 0,12%, Fa. Sunstar, CH-Etoy)
- EDTA (Ethylendiamintetraacetat, 1104, Fa. AppliChem, D-Darmstadt)
 - Herstellung einer Lösung mit 0,268 mol/L (10%), Einstellung auf pH 6 oder pH 7 mit Natriumhydroxid (NaOH)
 - Herstellung einer Lösung mit 0,456 mol/L (17%), Einstellung auf pH 7 mit NaOH
- Natriumhypochlorit (Hypochlorit Dentallösung 5,25%, 1047, Fa. Speiko GmbH, D-Münster)
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS 1x) (Dulbecco-PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , 182-05, Fa. Biochrome, D-Berlin)
- Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat 0,476 mol/L = 10% bei pH 2, 1.00244, Fa. Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Zitratpuffer (Citronensäure-Monohydrat und tri-Natriumcitrat-Dihydrat 1,55 mol/L bei pH 5, 1.06448, Fa. Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Zitronensäurephosphatpuffer (Citronensäure-Monohydrat, tri-Natriumcitrat-Dihydrat und tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat 1,09 mol/L bei pH 7, 1.06578, Fa. Merck KGaA, D-Darmstadt)

4.1.3 Medikamente

Folgende Medikamente wurden für die Versuche verwendet:

- Chlorhexidin-Gel (Chlorhexamed® 1% Gel, Fa. GlaxoSmithKline, GB-Brentford)

- Kalziumhydroxidpräparate:
 - Ölbasiert (Produktprobe, Fa. DMG Dental Milestones Guaranteed, D-Hamburg)
 - Wasserbasiert (Calxyl®, 0482, Fa. OCO Präparate GmbH, D-Dirmstein)
- Ledermix® (104840, Fa. Riemser Pharma GmbH, D-Greifswald)
- Triple-Antibiotika-Paste (Tre-Vita-Mix, Apotheke Dr. Hörmann, CH-Weinfelden)
Inhaltsstoffe:
 - 20 mg Ciprofloxacin, 20 mg Cefuroxim, 40 mg Metronidazol
 - Macrogoli unget. & Propylenglycolum

4.1.4 Labormaterialien und Geräte

Folgende Labormaterialien und Geräte kamen zum Einsatz:

Chloramin T (Chloramin T Trihydrat, 0,5%ige Lösung, 102426, Fa. Merck KGaA, D-Darmstadt)

ELISA (Human TGF- β 1 Quantikine® ELISA Kit, DB100B, Fa. R&D Systems, D-Wiesbaden)

Eppendorfcups (1,5 mL, Fa. Eppendorf AG, D-Hamburg)

Gefrierschrank (Forma scientific 923 -86 Freezer, Fa. Thermo Electron Corp., USA-Waltham)

Inkubator (C150, Fa. Binder, D-Tuttlingen)

Innenlochsägemikrotom (Leitz SP1600, Fa. Leica Biosystems GmbH, D-Wetzlar)

Kühlschrank (CT-2831, Fa. Liebherr, CH-Bulle)

Magnetrührer (RET, Fa. IKA®-Werke GmbH & Co. KG, D-Staufen)

Multiwell-Platten (24- und 48-Multiwell-Platten, 662 160, 677 180, Fa. greiner bio-one GmbH, D-Frickenhäusen)

NaOH (Natriumhydroxid, 1.06498, Fa. Merck KGaA, D-Darmstadt)

PalaDur (Pulver: 64707963, Fl.: 64707938, Fa. Heraeus Kulzer GmbH, D-Hanau)

pH-Messgerät (InoLab pH 7110, Fa. WTW GmbH, D-Weilheim)

Photometer (Infinite F200, Fa. Tecan Group AG, CH-Männedorf)

Pipetten (research plus, Fa. Eppendorf AG, D-Hamburg)

Pipettenspitzen (30 µl, 200 µl, 1000 µl, Fa. Sarstedt AG & Co, D-Nümbrecht)

Schüttler (KM2, Fa. Edmund Bühler GmbH, D-Hechingen)

Software ELISA: Magellan 7.1 (Fa. Tecan Group AG, CH-Männedorf)

Software grafische Darstellung Statistik: SigmaPlot (Fa. Systat Software Inc., USA-Chicago)

Software Statistik: SPSS Statistics 22 für Windows (Fa. IBM Corp., USA-Armonk)

Waage (BP 3100 S, Fa. Sartorius AG, D-Göttingen)

4.2 Versuch 1: Demineralisation des Dentins zur Wachstumsfaktorfreisetzung

Die benötigten Dentinscheiben wurden in neue 48-Multiwell-Platten platziert. Zur Konditionierung des Dentins wurden je 100 µl der zu testenden Lösung auf die Dentinscheiben pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 5, 10 oder 20 Minuten wurde die Lösung von den Dentinscheiben abgenommen, in je ein Eppendorfcup pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur Auswertung im Gefrierschrank bei -80° C. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Versuchsgruppen und die verwendeten Lösungen.

Versuchsgruppe:	Konditionierung der Dentinscheiben:	
	Verwendete Lösung	Zeitangabe
A	EDTA pH 6; 0,268 mol/L (10%)	5 min
		10 min
		20 min
B	EDTA pH 7; 0,268 mol/L (10%)	5 min
		10 min
		20 min
C	EDTA pH 7; 0,456 mol/L (17%)	5 min
		10 min
		20 min
D	Zitronensäure pH 2; 0,476 mol/L (10%)	5 min
		10 min
		20 min
E	Zitratpuffer pH 5	5 min
		10 min
		20 min
F	Zitronensäurephosphatpuffer pH 7	5 min
		10 min
		20 min

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen und die verwendeten Lösungen zur Konditionierung des Dentins

Um das Potential der getesteten Lösungen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus dem Dentin zu bestimmen, erfolgte eine Quantifizierung von Wachstumsfaktoren aus den gewonnenen Proben. Dazu wurde TGF- β 1 als repräsentativer Wachstumsfaktor bestimmt und durch einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen.

In einem Vorversuch wurde die Kompatibilität der Testsubstanzen mit den TGF- β 1-Antikörpern des verwendeten ELISA-Kits untersucht. Hierfür erfolgte die Quantifizierung einer bekannten Konzentration des rekombinanten TGF- β 1 (enthalten im ELISA-Kit), welche in den Testsubstanzen gelöst wurde. Es kam zu keiner Störung der Antigen-Antikörper-Bindung, da die Auswertung des ELISA die gleiche Konzentration an TGF- β 1 ergab, welche zuvor gelöst worden war. NaOCl wies in dem Vorversuch aufgrund des alkalischen pH-Werts von 12 keine Kompatibilität mit dem ELISA-Kit auf

und konnte daher in diesem Versuch nicht getestet werden.

4.3 Versuch 2: Kombination von Spüllösungen

Für den Versuch wurden erneut Dentinscheiben in 48-Multiwell-Platten platziert. Auf jede Dentinscheibe wurde 500 µl CHX oder NaOCl pipettiert und die Multiwell-Platte auf einen Schüttler (150 min^{-1}) gelegt. Die Einwirkzeit hierbei betrug 5 oder 10 Minuten. Anschließend wurde ein Waschschrift durchgeführt, indem die Dentinscheiben in Wells mit je 500 µl PBS 1x gesetzt und erneut für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt wurden. Danach erfolgte die Konditionierung der Dentinscheiben in neuen Wells. Aufgrund der Ergebnisse des ersten Versuchs zur Demineralisation des Dentins, wurden für die Konditionierung der Dentinscheiben in diesem Versuch ausschließlich EDTA 0,268 mol/L (10%) bei pH 7 verwendet. Nach einer Einwirkzeit von 5, 10 oder 20 Minuten wurden die 100 µl EDTA wieder von den Dentinscheiben abgenommen und in Eppendorfcups pipettiert. Nach sofortigem Gefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung im Gefrierschrank bei -80°C . Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über den Versuchsablauf, die Versuchsgruppen und die verwendeten Spüllösungen.

Versuchsgruppe:	Behandlung der Dentinscheiben:		
	Spüllösung	Zwischenspülung	Konditionierung mit EDTA
A	CHX für 5 min	PBS für 5 min	5 min
			10 min
			20 min
B	CHX für 10 min	PBS für 5 min	5 min
			10 min
			20 min
C	NaOCl für 5 min	PBS für 5 min	5 min
			10 min
			20 min
D	NaOCl für 10 min	PBS für 5 min	5 min
			10 min
			20 min

Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsgruppen und die verwendeten Spüllösungen mit anschließender Konditionierung des Dentins

Die Auswertung der gewonnen Proben erfolgte analog zum Versuch 1 anhand der Quantifizierung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 mithilfe eines ELISA-Testsystems.

4.4 Versuch 3: Anwendung von Medikamenten

Die benötigten Dentinscheiben wurden in 24-Multiwell-Platten platziert. Die zu testenden Medikamente wurden nun gleichmäßig mit einem Spatel auf eine Seite der Dentinscheiben aufgetragen. Damit sollte eine medikamentöse Einlage, wie sie in der Endodontie im Wurzelkanal gebräuchlich ist, imitiert werden. Die Dentinscheiben wurden erneut in Multiwell-Platten gesetzt. Die anschließende Lagerung erfolgte in einem Inkubator unter feuchten Bedingungen bei 37° C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Um die behandelte Seite der Dentinscheibe wiederzuerkennen, wurde die jeweils andere Seite zuvor mit Bleistift markiert. Nach einer 24-stündigen Einwirkzeit wurden die Dentinscheiben dreimal mit jeweils 500 μ l PBS mit der Pipette abgespült, bis alle sichtbaren Medikamentenrückstände beseitigt waren. Bei dem ölbasierten Kalziumhydroxidpräparat musste zusätzlich ein Wattestäbchen zur Reinigung verwendet werden, da sich der ölige Film durch alleiniges Abspülen nicht entfernen ließ. Nach

durchgeführter Reinigung kamen die Dentinscheiben mit der behandelten Seite nach oben in neue Wells einer 48-Multiwell-Platte. Aufgrund der Ergebnisse des ersten Versuchs erfolgte auch hier die Konditionierung des Dentins ausschließlich mit EDTA 0,268 mol/L (10%) bei pH 7. Nach 5, 10 oder 20 Minuten wurden die 100 µl EDTA von den Dentinscheiben abgenommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und im Gefrierschrank bei -80° C gelagert. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über den Versuchsablauf, die Versuchsgruppen und die verwendeten Materialien.

Versuchsgruppe:	Behandlung der Dentinscheiben:		
	Medikament für 24 h	Zwischenspülung	Konditionierung mit EDTA
A	Ledermix	PBS	5 min
			10 min
			20 min
B	Kalziumhydroxid wasserbasiert (Calxyl)	PBS	5 min
			10 min
			20 min
C	Kalziumhydroxid ölbasiert	PBS	5 min
			10 min
			20 min
D	Triple-Antibiotika-Paste	PBS	5 min
			10 min
			20 min
E	CHX-Gel	PBS	5 min
			10 min
			20 min

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsgruppen und die verwendeten Medikamente mit anschließender Konditionierung des Dentins

Die Auswertung der gewonnen Proben erfolgte analog zum Versuch 1 anhand der Quantifizierung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 mithilfe eines ELISA-Testsystems.

4.5 ELISA

Bei einem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) handelt es sich um eine immunologische Methode zur Detektion von bestimmten Antigenen oder Antikörpern. Die in diesen Versuchsreihen verwendeten ELISA-Kits enthielten eine 96-Multiwell-Platte, die bereits mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern beschickt worden waren. Diese Antikörper dienten dazu, den gesuchten Wachstumsfaktor TGF- β 1 aus den zu untersuchenden Proben zu binden. Dazu wurde im ersten Schritt jedes Well mit je 50 μ l einer zuvor gewonnenen Probe befüllt. Hinzu kamen 50 μ l des *Assay Diluent RD1-21*, einer proteinhaltigen Lösung zur Stabilisierung der Wachstumsfaktoren. Als Referenzwert wurde bei jedem ELISA eine Verdünnungsreihe einer bekannten Konzentration an rekombinanten TGF- β 1 gemessen. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe reichten von 2000 pg/mL bis 31,2 pg/mL, Zusätzlich wurde mit einer Messung der Lösung, die zur Verdünnung des Standards verwendet wurde und im ELISA-Kit enthalten war, auch ein Leerwert ermittelt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit einem Tensid-haltigen Waschpuffer ausgewaschen. Nach dem Trocknen der Platte auf Tüchern erfolgte die Zugabe von je 100 μ l *TGF- β 1 Conjugate*, welches polyklonale Antikörper gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP) enthielt, die an dem vorhandenen, bereits gebundenem TGF- β 1 binden sollten. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit erfolgten erneut drei Waschvorgänge. Nach Zugabe von 100 μ l *Color Reagent A+B* wurde das darin enthaltene Chromogen Tetramethylbenzidin durch die HRP aktiviert und es kam zu einem Farbumschlag ins Blaue. Diese Farbreaktion war proportional zur Menge an vorhandener Antikörperkonzentration. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln wurde die Farbreaktion für die Messung der Antikörperkonzentration mit 100 μ l Chlorwasserstoffsäure gestoppt. Dabei fand ein Farbumschlag ins Gelbe statt. Die Messung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzmessung bei 540 nm. Die Berechnung der Daten und Darstellung der Normgeraden erfolgte mithilfe der Software Magellan 7.1 (Fa. Tecan Group AG, Männedorf-Schweiz). Die Nachweisgrenze (NG) für TGF- β 1 lag in diesen ELISA-Kits bei 15,4 pg/mL (223).

4.6 Datenauswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software SPSS Statistics 22 (Fa. IBM Corp., Armonk-USA) für Windows. Die grafische Darstellung der Menge an freigesetztem TGF- β 1 wurde mit SigmaPlot (Fa. Systat Software Inc., Chicago-USA) durchgeführt. Berechnet und grafisch dargestellt wurden der Median sowie die 25%- und 75%-Perzentilen. Die statistische Analyse erfolgte mittels nichtparametrischer Mann-Whitney-Tests mit einer Anpassung des Signifikanzniveaus ($\alpha=0,05$) zur Fehlerkorrektur (224). Die statistische Auswertung sowie die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Herrn Dr. K.-A. Hiller (Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universitätsklinikum Regensburg).

5 Ergebnisse

5.1 Versuch 1: Demineralisation des Dentins zur Wachstumsfaktorfreisetzung

In der Abbildung 1 sind die Ergebnisse des ersten Versuchs graphisch dargestellt. Verschiedene demineralisierende Lösungen wirkten für 5, 10 oder 20 Minuten auf die Oberfläche von Dentinscheiben ein. Die Quantifizierung des dadurch freigesetzten Wachstumsfaktors TGF- β 1 erfolgte mithilfe von ELISA. Die Nachweisgrenze des ELISA wurde in den Abbildungen mit NG gekennzeichnet.

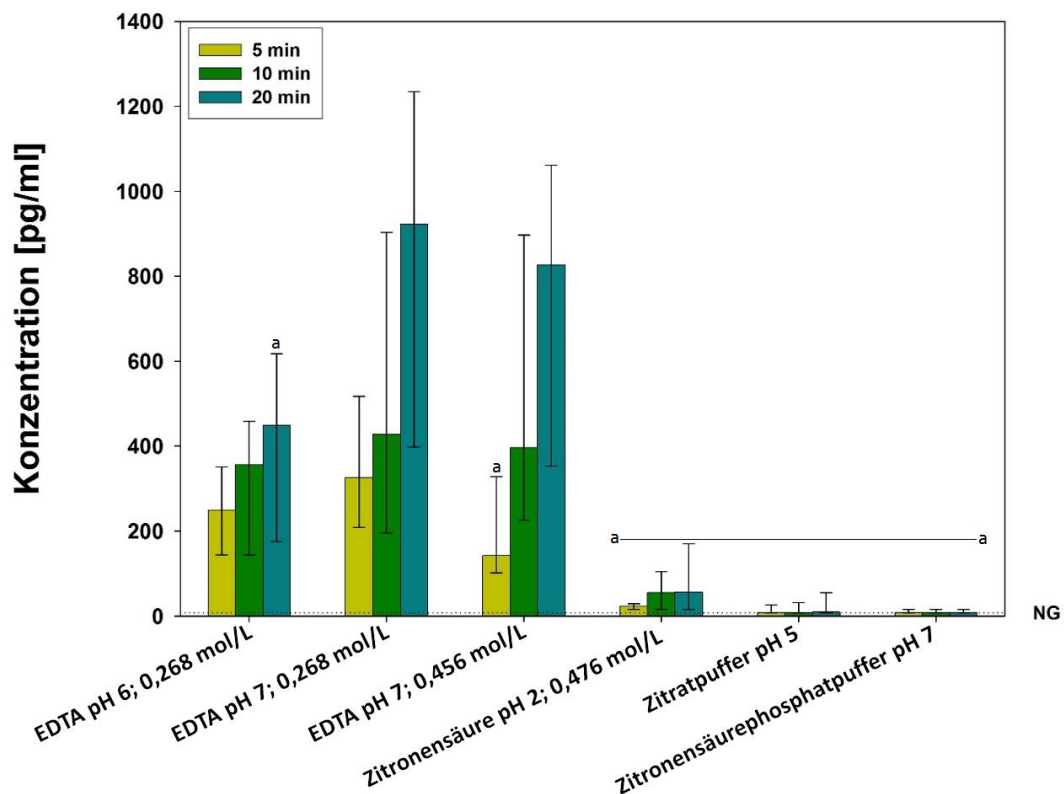


Abbildung 1: Freisetzungsprofil von TGF- β 1 durch Demineralisation des Dentins mit verschiedenen Lösungen für eine Dauer von 5, 10 oder 20 Minuten. Abgebildet wurden Mediane sowie 25%- und 75%-Perzentilen.

Es konnte gezeigt werden, dass mit einer längeren Einwirkzeit von demineralisierenden Lösungen auch eine größere Menge an TGF- β 1 aus dem Dentin freigesetzt wird. Beim Vergleich der drei verschiedenen Einwirkzeiten einer Lösung zueinander konnten dabei signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Des Weiteren wurde ersichtlich, dass sämtliche EDTA-Lösungen eine deutlich messbare Wachstumsfaktorfreisetzung erzielten. Im Vergleich der gleichkonzentrierten EDTA-Lösungen (10%; 0,268 mol/L) mit unterschiedlichen pH-Werten konnte mit EDTA bei pH 7 die größere Menge an TGF- β 1 freigesetzt werden. Bei einer Einwirkzeit von 20 Minuten bestand dabei ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der EDTA-Lösung bei pH 6. Im Vergleich der verschieden konzentrierten EDTA-Lösungen bei gleichem, neutralen pH-Wert konnte bei der höherkonzentrierten Lösung (17%; 0,456 mol/L) keine erhöhte Wachstumsfaktorfreisetzung festgestellt werden. Bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten erzielte das niedrig konzentrierte EDTA sogar eine signifikant größere Menge an TGF- β 1. Demzufolge wurde EDTA 10% bei pH 7 auch mit den anderen getesteten Lösungen verglichen. In der Abbildung wurden signifikante Unterschiede zwischen allen Testlösungen und EDTA 10% bei pH 7 mit „a“ gekennzeichnet.

Nach Behandlung der Dentinscheiben mit Zitratpuffer oder Zitronensäurephosphatpuffer konnten selbst nach einer 20-minütigen Einwirkzeit nur geringe Mengen an TGF- β 1 gemessen werden, diese lagen bei allen drei Einwirkzeiten im Bereich der Nachweisgrenze des Tests. Im Vergleich zu EDTA 10% bei pH 7 bestand daher stets ein deutlich signifikanter Unterschied. Zitronensäure konnte ein sichtbares, zeitabhängiges Freisetzungsprofil erzielen, jedoch mit deutlich geringeren Mengen an TGF- β 1 verglichen zu EDTA.

Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse der hohen Freisetzung von TGF- β 1 durch EDTA 10% bei pH 7 wurde dieses für die Folgeversuche zur Demineralisation von Dentin verwendet.

5.2 Versuch 2: Kombination von Spüllösungen

In der folgenden Versuchsreihe wurde erneut die freigesetzte Menge an TGF- β 1 durch EDTA 10% bei pH 7 nach verschiedenen Einwirkzeiten gemessen. Zuvor erfolgte jedoch eine Vorbehandlung der Dentinscheiben mit CHX oder NaOCl. Um die Auswirkung einer Vorbehandlung des Dentins vor Konditionierung zu erfassen, wurde als Referenzwert die alleinige Konditionierung des Dentins mit EDTA 10% bei pH 7 herangezogen. Zur besseren Übersicht erfolgte die Darstellung des Referenzwerts in der Abbildung 2 durch

die schmälere Balken. Signifikante Unterschiede zum Referenzwert wurden mit „a“ gekennzeichnet.

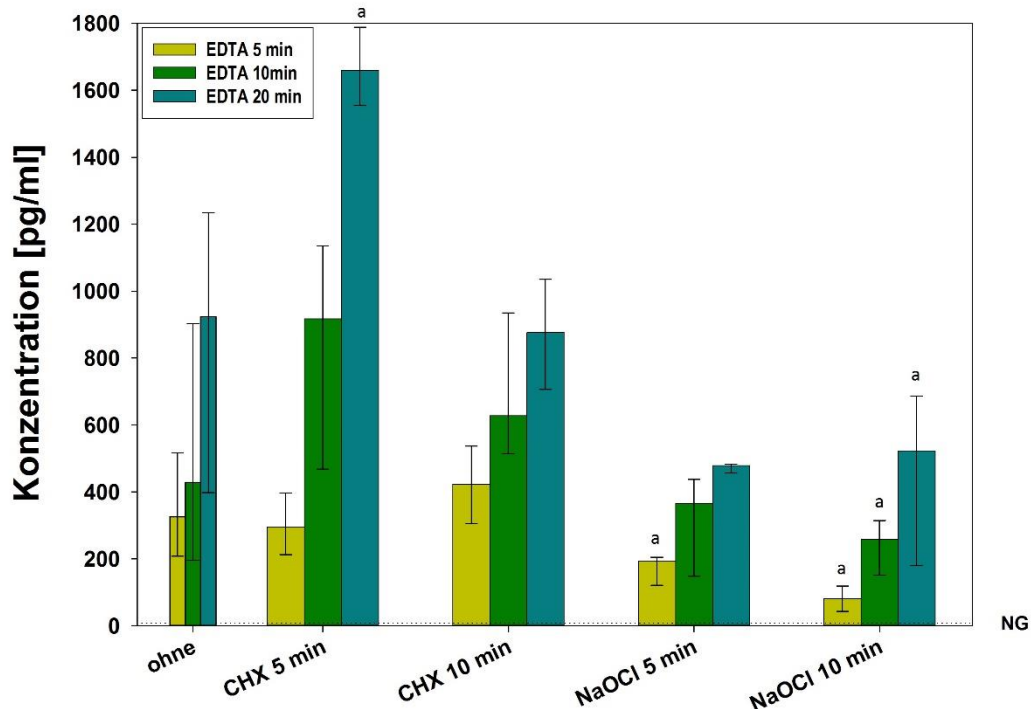


Abbildung 2: Freisetzungsprofil von TGF- β 1 durch Demineralisation von Dentin mit EDTA 10% bei pH 7 für eine Dauer von 5, 10 oder 20 Minuten. Zuvor erfolgte eine Vorbehandlung des Dentins mit CHX oder NaOCl jeweils für 5 oder 10 Minuten. Abgebildet wurden Mediane sowie 25%- und 75%-Perzentilen. Als Referenzwerte wurden die Daten für die alleinige Konditionierung des Dentins mit EDTA aus dem Versuch 1 übernommen und hier als schmälere Balken dargestellt.

In diesem Versuch war eine zeitabhängige Komponente bei der Wachstumsfaktorfreisetzung von TGF- β 1 durch EDTA bei allen getesteten Spüllösungs-Kombinationen zu erkennen.

Eine Vorbehandlung des Dentins mit CHX für 5 Minuten bewirkte eine höhere Freisetzung von TGF- β 1. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten mit EDTA bestand ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber dem Referenzwert. Eine 10-minütige Vorbehandlung mit CHX führte zu einer ähnlich großen Menge an freigesetztem TGF- β 1 wie bei einer alleinigen Konditionierung mit EDTA. Beim Vergleich der beiden unterschiedlich langen CHX-Vorbehandlungen gegeneinander konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Eine Vorbehandlung des Dentins mit NaOCl für 5 Minuten reduzierte die Menge an

TGF- β 1. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach einer Einwirkzeit des EDTA von 5 Minuten. Eine Vorbehandlung mit NaOCl für 10 Minuten führte bei allen Demineralisierungszeiten gegenüber dem Referenzwert zu einer signifikant geringeren Menge an freigesetztem TGF- β 1. Beim Vergleich der unterschiedlich langen NaOCl-Vorbehandlungen gegeneinander konnte nur bei der nachfolgenden, fünfminütigen Konditionierung des Dentins ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei Gegenüberstellung der zwei verschiedenen Spüllösungen zueinander wurden sowohl nach einer 5- also auch nach einer 10-minütigen Vorbehandlung stets Unterschiede deutlich. Dabei führte eine NaOCl-Vorbehandlung zu einer signifikant geringeren Wachstumsfaktorfreisetzung als eine CHX-Vorbehandlung.

5.3 Versuch 3: Anwendung von Medikamenten

In dieser Versuchsreihe wurden Dentinscheiben für 24 Stunden mit Medikamenten behandelt. Anschließend wurden die Dentinscheiben für 5, 10 oder 20 Minuten mit EDTA 10% bei pH 7 konditioniert. Die Quantifizierung des freigesetzten Wachstumsfaktors TGF- β 1 erfolgte mithilfe eines ELISA. Die erzielten Ergebnisse wurden in Abbildung 3 dargestellt. Zur besseren Übersicht erfolgte in der Abbildung auch die Darstellung eines Referenzwerts durch schmälere Balken. Als Referenzwert dienten die Ergebnisse aus dem Versuch 1 zur alleinigen Dentinkonditionierung mit EDTA 10% bei pH 7. Signifikante Unterschiede zum Referenzwert wurden mit „a“ gekennzeichnet.

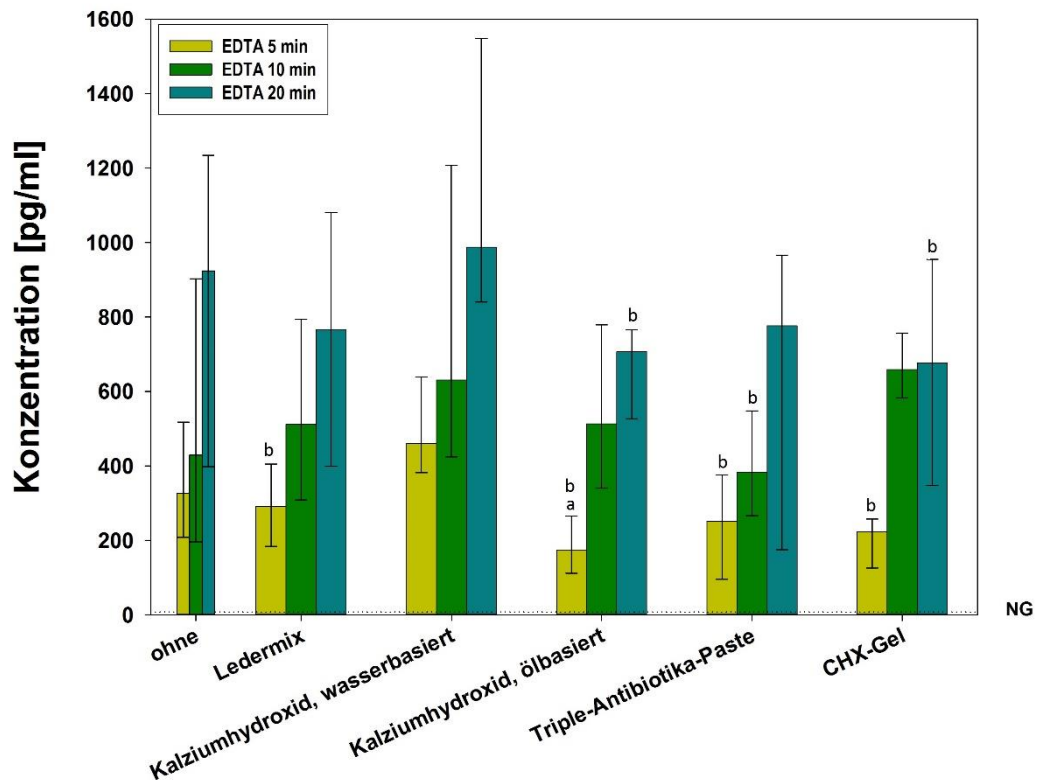


Abbildung 3: Freisetzungsprofil von TGF- β 1 nach einer Vorbehandlung des Dentins für 24 Stunden mit Medikamenten und anschließender Demineralisation mit EDTA 10% bei pH 7 für 5, 10 oder 20 Minuten. Dargestellt wurden Mediane sowie 25%- und 75%-Perzentilen. Als Referenzwerte wurden die Daten für die alleinige Konditionierung des Dentins mit EDTA aus dem Versuch 1 übernommen und hier als schmälere Balken dargestellt.

Wie in den Versuchen zuvor zeigte sich mit einer längeren Demineralisierungszeit auch eine erhöhte Freisetzung von TGF- β 1. Allgemein wurde nach Behandlung mit den Medikamenten eine ähnliche Menge an TGF- β 1 wie beim Referenzwert freigesetzt. Ein signifikant geringerer Unterschied bestand lediglich nach Vorbehandlung mit dem ölbasiertem Kalziumhydroxid-Präparat und anschließender 5-minütiger Dentinkonditionierung. Eine längere EDTA-Konditionierung des Dentins nach erfolgter Vorbehandlung mit ölbasiertem Kalziumhydroxidpräparats erzielte wieder ähnliche Werte verglichen zum Referenzwert.

Wasserbasiertes Kalziumhydroxid (Calxyl) zeigte bei allen Einwirkzeiten etwas höhere Mengen an freigesetztem TGF- β 1, auch gegenüber dem Referenzwert. Hierbei konnte aber kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurde Calxyl auch im Vergleich zu den anderen Medikamenten getestet. Dabei konnten zum Teil mehrfach signifikante Unterschiede festgestellt werden, welche

in der Abbildung 3 mit „b“ gekennzeichnet wurden.

Nach einer fünfminütigen Dentinkonditionierung konnte nach Calxyl-Vorbehandlung signifikant mehr TGF- β 1 freigesetzt werden als nach allen anderen Medikamentenbehandlungen. Im Vergleich zum ölasierten Kalziumhydroxid-Präparat, bestand auch nach 20 Minuten ein signifikanter Unterschied. Das gleiche galt für die Vorbehandlung mit CHX-Gel. Eine signifikant geringere Menge war außerdem bei einer Vorbehandlung mit Triple-Antibiotika-Paste und 10-minütiger Dentinkonditionierung messbar.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener, in der Endodontie gebräuchlicher Spüllösungen und Medikamente auf die Wachstumsfaktorfreisetzung aus Dentin untersucht. Dabei wurde TGF- β 1 als repräsentativer Wachstumsfaktor gewählt, da er eine Schlüsselrolle in der regenerativen Endodontie spielt (225). Zudem wurde in einer weiteren Studie das Freisetzungsprofil von FGF-2 und VEGF ermittelt, die verglichen zu TGF- β 1 nur in geringeren Mengen im Dentin gefunden wurden (226). Daher kann die Auswirkung verschiedener Substanzen auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren mit TGF- β 1 deutlicher gezeigt werden.

In dieser Studie wurden Dentinscheiben mit einer definierten Größe hergestellt, um möglichst standardisierte Bedingungen zu erhalten. Bei der Wachstumsfaktorfreisetzung war dennoch stets eine Schwankungsbreite messbar. Dies könnte in Zusammenhang mit einer zunehmenden Verkalkung des Dentins bei höherem Alter des Patienten stehen oder aber einfach vom jeweiligen Individuum abhängig sein (227). Eine weitere mögliche Erklärung dafür könnte die unterschiedlich große Anzahl an Dentintubuli sein, die je nach näherer Lagebeziehung zum Schmelz oder zur Pulpa variiert (5). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von verschiedenen Dentinscheiben sind diese Unterschiede auch deutlich erkennbar (142).

6.1 Demineralisation des Dentins zur Wachstumsfaktorfreisetzung

6.1.1 Ergebnisse

Zitronensäure und die getesteten zitronensäurehaltigen Lösungen führen auf unterschiedliche Weise zu einer Demineralisation von Dentin. Während Zitronensäure bei pH 2 und Zitratpuffer bei pH 5 vorwiegend als Säure demineralisieren, fungiert Zitronensäurephosphatpuffer bei pH 7 als Komplexbildner. Verglichen mit dem potenten Komplexbildner EDTA zeigte Zitronensäurephosphatpuffer mit nur drei Bindungsstellen weitaus schlechtere Ergebnisse. Die freigesetzte Wachstumsfaktormenge nach Konditionierung mit Zitratpuffer und Zitronensäurephosphatpuffer befand sich bereits an der Nachweisgrenze des ELISA. Ein pH-Wert von 5 oder 7 scheint bei den Zitronensäurederivaten zu einer zu geringen Demineralisation des Dentins zu führen.

Zitronensäure konnte zwar etwas mehr Wachstumsfaktoren freisetzen, jedoch scheint ein pH-Wert von 2 die Stabilität der Wachstumsfaktoren negativ zu beeinflussen. Obwohl Zitronensäure zu einer guten Demineralisation von Dentin führt (192), ist sie zur Wachstumsfaktorfreisetzung aufgrund des pH-Werts augenscheinlich nicht geeignet. Der Einfluss des pH-Werts wird auch bei der Verwendung von EDTA deutlich. Bereits ein pH-Wert von 6 führt zu einer signifikant geringeren Menge an freigesetzten TGF- β 1 verglichen mit der Wachstumsfaktorfreisetzung durch EDTA im neutralen pH-Bereich. EDTA bei pH 7 und 10% erwies sich in dieser Studie als effektives Agens zur Wachstumsfaktorfreisetzung. Auch eine höhere Konzentration von 17% konnte keine größere Menge an TGF- β 1 freisetzen.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die freigesetzte Menge an Wachstumsfaktoren sowohl von der Demineralisationsqualität als auch von der Stabilität der Proteine in Lösung abhängt. Neutrales EDTA scheint hier am besten geeignet. In den Empfehlungen der AAE und der ESE zur Revitalisierung soll zur Konditionierung des Dentins 17%iges EDTA verwendet werden (132, 134). Diese Studie konnte jedoch zeigen, dass 10%iges EDTA die besten Ergebnisse bezüglich einer Wachstumsfaktorfreisetzung erzielt. Daher könnte zur Konditionierung des Dentins im Rahmen von regenerativen endodontischen Maßnahmen auch geringer konzentriertes EDTA verwendet werden, um somit auch die zytotoxischen Effekte zu verringern.

An diesen Versuchen könnten die langen Einwirkzeiten der Lösungen und die geringe Menge an freigesetzten Wachstumsfaktoren als kritisch angesehen werden. Bezogen auf die Menge an Wachstumsfaktoren, werden bei *in vitro* Studien mit rekombinanten Wachstumsfaktoren weitaus höhere Konzentrationen von 1 bis 50 ng/mL verwendet (73, 75). Da jedoch auch bereits geringste Mengen an Wachstumsfaktoren zelluläre Reaktionen bewirken, könnte auch die geringere Menge an Wachstumsfaktoren aus dem Dentin dafür ausreichend sein (141). Außerdem ist nicht abschließend geklärt, ob eine zu hohe Menge an Wachstumsfaktoren negative Auswirkungen wie eine veränderte Immunogenität oder Tumorentstehung verursachen könnte. Bezogen auf die verwendeten Einwirkzeiten in dieser Studie wären in klinischen Situationen Einwirkzeiten von 10 oder sogar 20 Minuten wenig praktikabel. Jedoch konnten in diesen Versuchen bereits nach 5-minütiger Einwirkzeit Wachstumsfaktoren im Nanogrammbereich freigesetzt werden. Zur Verkürzung der Einwirkzeit und zur Erhöhung der Menge an freigesetzten Wachstumsfaktoren scheint die Aktivierung der Spüllösung mittels Ultraschall ein

probates Mittel zu sein (142).

6.1.2 Freilegung von Wachstumsfaktoren an der Dentinoberfläche

Durch eine Demineralisation von Dentin gehen Wachstumsfaktoren nicht nur in Lösung über, sondern werden auch an der Dentinoberfläche freigelegt. In einer Studie dazu wurden nach unterschiedlichen Dentinkonditionierungen freigelegte Wachstumsfaktoren durch Goldlabeling visualisiert (226). Dabei konnte nach einer EDTA-Vorbehandlung die größte Menge TGF- β 1 an der Oberfläche detektiert werden. Exponierte Wachstumsfaktoren auf der Dentinoberfläche fördern Chemotaxis von Stammzellen aus dem apikalen Gewebe (120, 228) und auch eine Differenzierung zu sekundären Odontoblasten (71, 90, 141, 229). Die organische Matrix mit ihren Kollagenfibrillen, die nach Konditionierung mit EDTA freigelegt wird, begünstigt eine Zelladhäsion an Dentin durch Integrin-Rezeptoren (230, 231) und fördert eine höhere Überlebensrate durch die Schaffung einer physiologischen Umgebung für Zellen (232, 233).

Aus diesen Gründen sollte eine EDTA-Konditionierung im Rahmen einer regenerativen endodontischen Therapie durchgeführt werden, wie es bereits von der AAE und ESE bei der Revitalisierung empfohlen wird. Die Ergebnisse dieser Studie können demnach die Empfehlung zur Verwendung von EDTA zur Schaffung einer geeigneten Dentinoberfläche sowie Wachstumsfaktorfreisetzung bekräftigen.

6.1.3 Bedeutung für regenerative endodontische Therapiemaßnahmen

In Hinblick auf eine Verwendung von herausgelösten Wachstumsfaktoren im Rahmen einer regenerativen endodontischen Therapie würde man diese gemeinsam mit der EDTA-Lösung verwerfen. Die Weiterverwendung ist aufgrund der Zytotoxizität von EDTA und einer möglichen Gewebeschädigung nicht gegeben (193, 234, 235). Für eine Nutzung von dentineigenen Wachstumsfaktoren müssten sich diese in einer physiologischen Lösung befinden. Eine Studie dazu konnte zeigen, dass bei einem Nachspülen mit physiologischem PBS nach erfolgter Dentinkonditionierung auch Wachstumsfaktoren in diese Lösung übergehen können (142). Dieser Effekt kann auch durch die Ultraschallaktivierung der Lösung und eine damit verbundene bessere Penetration in das Dentin erhöht werden. Zudem könnte auch alleine das Nachspülen mit einer physiologischen Lösung eine Neutralisation der zytotoxischen Effekte von EDTA

und somit auch eine bessere Umgebung für Zellen bewirken. Im Rahmen von regenerativen endodontischen Therapiemaßnahmen könnte die Verwendung von autologen Wachstumsfaktoren eine Optimierung des klinischen Ergebnisses bedeuten, wenn sie beispielsweise gemeinsam mit einem Trägermaterial zurück in den Kanal eingebracht werden (126, 236).

In einer Studie wurde ein klinischer Einsatz der Wachstumsfaktorfreisetzung noch weiter untersucht und dazu die Wachstumsfaktorfreisetzung aus aufbereiteten Wurzelkanälen gemessen (142). Dabei konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass auch die viel kleinere Oberfläche von Wurzelkanälen im Vergleich zu Dentinscheiben eine verhältnismäßig große Menge an Wachstumsfaktoren mit Ultraschallaktivierung freisetzen kann (237–239). Nachteilig an der Ultraschallaktivierung ist die oberflächliche Entstehung von Erosionen an der Dentinstruktur (142). Diese Studie konnte zeigen, dass eine Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin auch in Hinblick auf klinische Bedingungen gut durchführbar ist und die Verwendung von autogenen Wachstumsfaktoren eine Optimierung der Erfolgsaussichten sowie eine Ausweitung der Indikation einer regenerativen endodontischen Therapie bedeuten könnte. Möglicherweise befindet sich dafür im Dentin sogar genau die richtige Kombination und Konzentration von bioaktiven Faktoren.

6.2 Kombination von Spüllösungen

6.2.1 Ergebnisse

In der Endodontie ist es gebräuchlich, verschiedene desinfizierende Spüllösungen zu kombinieren. Während der Aufbereitung von Wurzelkanälen wird NaOCl verwendet, danach erfolgt eine Abschlusspülung, bei welcher die entstandene Schmierschicht entfernt werden soll. Bei der Abschlusspülung kann auch eine weitere Spülung mit einer desinfizierenden Lösung erfolgen, um auch die freigelegten Dentintubuli zu erreichen. Mit diesem Versuch soll daher durch die Kombination von verschiedenen Spüllösungen das klinische Vorgehen einer endodontischen Behandlung imitiert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung des Dentins mit NaOCl die Menge an anschließend freigesetzten Wachstumsfaktoren mit EDTA reduziert. Dieser Effekt kann durch die Proteindenaturierung durch NaOCl erklärt werden

und betrifft nicht nur freie, sondern auch im Dentin gebundene Wachstumsfaktoren (43, 240). Da eine längere Einwirkzeit von EDTA auch eine fortschreitende Demineralisation des Dentins bedeutet, wurde die Auswirkung von NaOCl auf die Wachstumsfaktoren kompensiert. Mit den längeren Einwirkzeiten von EDTA konnte die Menge an freigesetztem TGF- β 1 wieder erhöht werden.

In dieser Versuchsreihe konnte nach einer kurzen Vorbehandlung des Dentins für 5 Minuten mit CHX anschließend eine erhöhte Menge an freigesetztem TGF- β 1 gemessen werden. Dieser Effekt kann durch den sauren pH-Wert von 5 von CHX erklärt werden, wodurch es zu einer zusätzlichen Demineralisation des Dentins kommt. Eine längere Einwirkzeit von CHX von 10 Minuten wirkt sich hingegen negativ auf die Wachstumsfaktorfreisetzung aus. Der längere Kontakt von CHX mit der Dentinoberfläche könnte die Proteinstabilität der Wachstumsfaktoren aufgrund des pH-Werts negativ beeinflussen. Möglicherweise erschwert auch die Substantivität von CHX eine nachfolgende Wachstumsfaktorfreisetzung. Der kurze Gebrauch von CHX erscheint in Bezug auf die Wachstumsfaktorfreisetzung jedoch unproblematisch verglichen zu NaOCl.

6.2.2 Natriumhypochlorit

In nahezu allen publizierten Fällen einer Revitalisierung wurde NaOCl verwendet (115, 241). Dabei wurde in etwa 63% aller Fälle mit 3%igem NaOCl und in 36% der Fälle mit 5 bis 6%igem NaOCl gespült, jedoch kam 1%iges NaOCl nur in etwa 1% der Fälle zum Einsatz (126). Bei einer Verwendung von NaOCl bis 3% wird das Überleben von Stammzellen der apikalen Papille auf 60% reduziert, höhere Konzentrationen vermindern die Überlebenswahrscheinlichkeit auf bis zu 20% (242). Um die toxischen Effekte abzuschwächen sollte im Rahmen einer regenerativen endodontischen Therapie ein Nachspülen mit NaCl oder EDTA erfolgen. EDTA kann die zytotoxischen Effekte auf dentale Stammzellen nach einer Vorbehandlung mit niedrigkonzentriertem NaOCl komplett und bei hohen Konzentrationen zum Teil aufheben (243, 244). Zudem wird das Zellüberleben auch durch eine optimale Oberflächenbeschaffenheit sowie Wachstumsfaktorfreisetzung deutlich verbessert (90, 141, 243). Der toxische Effekt von NaOCl, insbesondere auf die Stammzellen der apikalen Papille, darf gerade bei einer regenerativen endodontischen Therapie nicht vernachlässigt werden und daher ist die Konzentration sorgfältig zu wählen. Als akzeptabel erscheint eine Anwendung von bis zu

3%, wenn es in angemessener Menge und Dauer angewendet wird (134). NaOCl sollte hingegen nach einer EDTA-Konditionierung nicht verwendet werden, da es eine Denaturierung von Wachstumsfaktoren und eine Zerstörung des Kollagengerüsts bewirkt (226, 240, 245). Mikroskopische Untersuchungen zeigen dabei ein aufgelöstes Dentin sowie eine irreguläre und raue Dentinoberfläche (246, 247). Hohe Konzentrationen von NaOCl verhindern zudem eine Differenzierung von dentalen Stammzellen in sekundäre Odontoblasten *in vitro* und *in vivo* (43, 90, 248) und können zu Resorptionsvorgängen führen (43, 249).

Aus diesen Gründen empfiehlt die ESE bei einer Revitalisierung die Anwendung von NaOCl auf die erste Sitzung zu beschränken und ein Nachspülen mit EDTA durchzuführen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe gehen mit diesen Empfehlungen einher, da EDTA die negativen Auswirkungen von NaOCl kompensieren und auch die Stabilität der Wachstumsfaktoren im Dentin verbessern kann.

6.2.3 Chlorhexidin

In manchen Fallberichten zur Revitalisierung von jugendlichen Zähnen wurde CHX in einer Konzentration von 0,2 bis 2% verwendet und führte auch zu erfolgreichen Ergebnissen (114, 115, 250). Die Verwendung von CHX nach einer EDTA-Konditionierung zeigt jedoch zytotoxische Effekte auf dentale Stammzellen (248) und beeinflusst außerdem durch die Substantivität die Adhäsion von Zellen an der Dentinoberfläche (251). Dadurch kann es auch zu einem indirekten Verlust von Zellen führen, was durch ein Nachspülen mit NaCl abgeschwächt werden könnte (251). Da CHX zytotoxisch wirkt und eine Zelladhäsion verschlechtert, ist es kein optimales Mittel zur Desinfektion im Rahmen von regenerativen endodontischen Therapiemaßnahmen (115). Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie erscheint die Anwendung von CHX bezüglich einer nachfolgenden Wachstumsfaktorfreisetzung als unproblematisch. Da sich CHX jedoch negativ auf die Zelladhäsion auswirkt, sollte bei einer Anwendung unbedingt eine anschließende EDTA-Konditionierung erfolgen.

6.3 Anwendung von Medikamenten

6.3.1 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass intrakanaläre Medikamente Auswirkungen auf die Wachstumsfaktorfreisetzung haben, aber im Vergleich zum Referenzwert kaum signifikante Unterschiede auftraten. Eine größere Menge an freigesetztem TGF- β 1 nach Vorbehandlung mit Kalziumhydroxid könnte auf eine zusätzliche Demineralisation durch den alkalischen pH-Wert zurückzuführen sein. Eine längere EDTA-Konditionierung scheint diesen Effekt mit fortschreitender Dentinerosion jedoch wieder auszugleichen. Ölbasierendes Kalziumhydroxid, TAP und CHX-Gel zeigten verglichen zum Referenzwert etwas schlechtere Ergebnisse, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Diese Ergebnisse stimmen mit dem hartnäckigen Verbleiben von Medikamenten an der Dentinoberfläche trotz verschiedener Entfernungversuche überein und könnten daher eine geringere Menge an freigesetzten Wachstumsfaktoren erklären (252). In dieser Versuchsreihe gestaltete sich vor allem das Entfernen des ölbasierenden Kalziumhydroxids als schwierig, da bereits bei visueller Kontrolle ein öliger Rückstand erkennbar war. Bei CHX-Gel und auch bei der TAP konnten hingegen kaum Rückstände aufgrund der Transparenz der Substanzen gesehen werden. Ledermix hinterließ eine etwas verfärbte Dentinoberfläche.

In keinem Fallbeispiel zur Revitalisierung wurde bisher Ledermix oder CHX-Gel verwendet. Die Ergebnisse in dieser Studie zu diesen Medikamenten zeigen auch keinen Vorteil gegenüber dem gebräuchlichen Kalziumhydroxid oder TAP.

In dieser Studie könnte die Einwirkzeit der Medikamente als kritisch angesehen werden, da im klinischen Behandlungsablauf einer Revitalisierung intrakanaläre Medikamente für eine bis vier Wochen im Wurzelkanal belassen werden. Die Wirkung der Medikamente lässt zwar über die Zeit nach, dennoch wird die Dentinstruktur durch eine längere Einwirkzeit negativ beeinflusst (206).

6.3.2 Kalziumhydroxid

Durch eine Anwendung von Kalziumhydroxid werden die Dentineigenschaften negativ beeinflusst und führen bei einer Langzeitbehandlung zu signifikanten Unterschieden gegenüber unbehandeltem Dentin (106, 206). Die Entfernung von Kalziumhydroxid vom

Dentin der Wurzelkanalwand ist jedoch einfach und nahezu vollständig möglich (252). Kalziumhydroxid wird bereits von der AAE und ESE als medikamentöse Einlage bei der Revitalisierung wegen der geringen zytotoxischen Wirkung auf Stammzellen der apikalen Papille empfohlen. Es scheint sogar im Gegenteil das Überleben und die Proliferation von Stammzellen zu fördern (205). Kalziumhydroxid wurde bereits in mehreren Fallbeispielen mit Erfolg angewandt (253–255). Eine mit Kalziumhydroxid vorbehandelte Dentinoberfläche zeigte direkte positive Effekte auf Zellen (245, 256). Kalziumhydroxid könnte auch indirekt das Überleben von Zellen durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus dem Dentin unterstützen (56). Diese Studie geht auch mit den Empfehlungen der AAE und ESE zur Verwendung von Kalziumhydroxid bei der Revitalisierung einher, da es bei nachfolgender Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin bevorzugt verwendet werden sollte (226, 243, 256).

6.3.3 Triple-Antibiotika-Paste

TAP führt zu einer signifikanten Reduktion der Mikrohärtigkeit von Dentin um etwa 75% verglichen zu unbehandeltem Dentin und erhöht somit die Frakturgefahr (220). Das könnte durch den sauren Charakter (pH 2,9) und einer daraus resultierenden Demineralisation erklärt werden, sowie durch den Komplexbildner Minozyklin, welches in TAP enthalten ist (257–259). TAP wirkt sich negativ auf Dentineigenschaften wie Mikrohärtigkeit und Frakturresistenz aus (220, 258) und hat einen negativen Einfluss auf die chemische Struktur des Dentins (258, 260, 261). TAP könnte außerdem langfristige Veränderungen im Dentin bewirken, die zu einer Alterung der physikalischen Struktur oder auch zur Inaktivierung von eingeschlossenen Wachstumsfaktoren führen könnten (256). In direktem Kontakt bewirkt die Paste den Zelltod dentaler Stammzellen und könnte bei Applikation im Kanal durch Diffusion auch lokale Stammzellen der apikalen Papille beeinflussen. Trotz intensiver Versuche der Entfernung von TAP verbleibt diese hartnäckig am Dentin und kann selbst nach einer Entfernung von 99% noch toxische Auswirkungen auf Zellen zeigen (205). Möglicherweise könnte Dentin sogar als Reservoir für die TAP dienen und somit über einen längeren Zeitraum schädliche Auswirkungen haben. Obwohl es bereits zahlreiche erfolgreiche Fallbeispiele einer Revitalisierung mit TAP gibt, könnte die Toxizität von TAP das weitere Wurzelwachstum und die Regeneration des Zahnes negativ beeinflussen (126). Der zytotoxische Effekt auf Stammzellen der apikalen Papille kann durch Verwendung von Kalziumhydroxid

verhindert oder durch niedrigere Konzentrationen von TAP abgeschwächt werden (205, 256), da sich diese ohnehin bereits in geringeren Konzentrationen wirksam gegenüber endodontischen, pathogenen Keimen zeigt (262). Nicht zuletzt ist die Anwendung der enthaltenen Antibiotika insbesondere bei Kindern als sehr kritisch zu sehen. Da eine Revitalisierung jedoch bei jugendliche Zähne mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstums durchgeführt wird, sollte die Indikation zur Anwendung sehr eng gestellt werden und TAP nur in Ausnahmefällen, wie zum Beispiel bei bestehenden Beschwerden nach Kalziumhydroxid-Einlage, zum Einsatz kommen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine TAP-Vorbehandlung kaum negative Auswirkungen auf die Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin hat.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener, in der Endodontie gebräuchlicher Spüllösungen und Medikamente auf die Wachstumsfaktorfreisetzung aus Dentin untersucht. Dabei wurden mehrere Agenzien auf Dentinscheiben getestet und anschließend die Menge an freigesetztem Wachstumsfaktor TGF- β 1 mittels ELISA bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die größte Menge an Wachstumsfaktoren mit EDTA aus dem Dentin freigesetzt wird. 10%iges EDTA bei pH 7 konnte dabei quantitativ die besten Ergebnisse erzielen. Ein neutraler pH-Wert wirkte sich positiv auf die Stabilität der Wachstumsfaktoren aus. Hingegen scheinen Zitronensäure und deren Derivate für eine Wachstumsfaktorfreisetzung nicht geeignet zu sein.

Desinfizierende Spüllösungen wie NaOCl und CHX zeigten deutliche Auswirkungen auf eine nachfolgende Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin. NaOCl kann durch den hohen pH-Wert Wachstumsfaktoren deproteinieren und reduzierte folglich die Menge an freigesetzten Wachstumsfaktoren. CHX hingegen erschien bei einer kürzeren Einwirkzeit unproblematischer bezüglich der Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Eine anschließende Konditionierung des Dentins mit EDTA konnte abhängig von deren Einwirkzeit die negativen Effekte einer Vorbehandlung wieder ausgleichen.

Diese Studie konnte zeigen, dass Medikamente, die im Rahmen von endodontischen Behandlungen eingesetzt werden, eine anschließende Wachstumsfaktorfreisetzung beeinflussen. Während Kalziumhydroxid eine Erhöhung von freigesetzten Wachstumsfaktoren gegenüber unbehandeltem Dentin bewirkte, führten andere gebräuchliche Medikamente zu einer geringfügigen Reduktion der freigesetzten Menge an Wachstumsfaktoren. Die zum Teil problematische Entfernung von Medikamenten von der Dentinoberfläche könnte dieses Ergebnis erklären.

Diese Studie weist darauf hin, dass gerade im Rahmen einer regenerativen endodontischen Therapie die Anwendung von desinfizierenden Spüllösungen und Medikamenten genau bedacht werden sollte. Dennoch ist es nach verschiedenen Vorbehandlungen möglich, Wachstumsfaktoren mit einer EDTA-Konditionierung aus dem Dentin herauszulösen. Da Wachstumsfaktoren eine essenzielle Rolle bei zellulären Reaktionen spielen, könnten dentineigene Wachstumsfaktoren die Erfolgsaussichten einer Revitalisierung der Pulpa durch bessere Steuerung von zellulären Reaktionen

optimieren. Möglicherweise befindet sich dazu im Dentin genau die richtige Kombination und Konzentration an bioaktiven Proteinen. Eine gezielte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und eine Optimierung der Dentinoberfläche für Zelladhäsion und -differenzierung könnten eine bessere Vorhersehbarkeit des Therapieerfolges sowie möglicherweise auch eine Ausweitung von regenerativen endodontischen Therapiemöglichkeiten auf Zähne mit abgeschlossenem Wurzelwachstum bedeuten. Durch eine einfache Dentinkonditionierung und standardisierte Behandlungsempfehlungen könnten zudem die regenerative endodontische Therapie auch vermehrt im klinischen Alltag einer Zahnarztpraxis Einzug finden. Eine weitere Verbesserung könnte durch eine genauere Dokumentation und vermehrte Publikation von Fallbeispielen und auch durch das Ermitteln von Langzeitdaten herbeigeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Studie mit den Empfehlungen der AAE und ESE zur Revitalisierung einhergehen und die dort empfohlenen Spüllösungen und Medikamente auch für eine Wachstumsfaktorfreisetzung aus dem Dentin geeignet sind.

8 Literaturübersicht

1. Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *Journal of endodontics* 2014; 40(3):333–8.
2. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics - biologically-based treatment for immature permanent teeth: A case report and review of the literature. *Australian dental journal* 2010; 55(4):446–52.
3. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Journal of endodontics* 2013; 39(3):30–43.
4. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell research* 2005; 15(5):301–16.
5. Radlanski RJ. *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*. Berlin: Quintessenz-Verlag; 2011.
6. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 2011; 3:711–35.
7. Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC et al. Dental mineralization. *The International journal of developmental biology* 1995; 39(1):93–110.
8. Jones IL, Leaver AG. Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. *Archives of oral biology* 1974; 19(5):371–80.
9. Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavaleiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2009; 81(3):409–29.
10. Baker SM, Sugars RV, Wendel M, Smith AJ, Waddington RJ, Cooper PR et al. TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcified tissue international* 2009; 85(1):66–74.
11. Baume LJ. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monographs in oral science* 1980; 8:1–220.
12. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of oral biology* 2012; 57(2):109–21.
13. Roberts-Clark D, Smith A. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of oral biology* 2000; 45(11):1013–6.

14. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Archives of oral biology* 1997; 42(3):219–23.
15. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1990; 5(7):717–23.
16. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural Localisation of TGF-beta exposure in Dentine by Chemical Treatment. *The Histochemical journal* 2000; 32:489–94.
17. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GAM, Papa S, Mazzotti G et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *Journal of dental research* 2007; 86(5):436–40.
18. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *Journal of dental research* 2002; 81(9):603–7.
19. Sulkala M, Paakkonen V, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. *Connective tissue research* 2004; 45(4-5):231–7.
20. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Archives of oral biology* 2007; 52(2):121–7.
21. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R et al. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *Journal of inflammation* 2012; 9(1):8.
22. Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M et al. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC cell biology* 2005; 6(1):8.
23. Arai T, Busby W Jr, Clemmons DR. Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 1996; 137(11):4571–5.
24. Somasundaram R, Ruehl M, Tiling N, Ackermann R, Schmid M, Riecken EO et al. Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(49):38170–5.
25. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Developmental biology* 1991; 143(2):303–8.
26. Balic A, Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Current topics in developmental biology* 2015; 115:157–86.

27. Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *Journal of dental research* 1985; 64:489–98.
28. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature reviews. Genetics* 2004; 5(7):499–508.
29. Klimm W, Arnold M. *Endodontologie: Lehrbuch für Studium und Beruf*. 2. Auflage. Köln: Dt. Zahnärzte-Verlag; 2011.
30. Dean DD, Schwartz ZV, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS et al. Matrix vesicles contain metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Bone and mineral* 1992; 17(2):172–6.
31. Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. *European journal of oral sciences* 1998; 106(1):211–20.
32. Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie Endodontologie und Parodontologie*. 5. Auflage. Köln: Dt. Zahnärzte-Verlag; 2010.
33. Schumacher GH. *Anatomie für Zahnmediziner: Lehrbuch und Atlas*. 3. Auflage. Heidelberg: Hüthig; 1997.
34. Schroeder HE. *Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2000.
35. Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B et al. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *Journal of orofacial pain* 2010; 24(4):335–49.
36. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *Journal of dental research* 1987; 66(6):1149–53.
37. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2004; 15(1):13–27.
38. Bjørndal L. The caries process and its effect on the pulp: the science is changing and so is our understanding. *Journal of endodontics* 2008; 34(7):2–5.
39. Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Advances in dental research* 2011; 23(3):296–301.
40. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of dentistry* 2000; 28(2):77–92.
41. Calland JW, Harris SE, Carnes DL. Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro. *Journal of endodontics* 1997; 23(8):485–9.

42. Morsczeck C, Reichert TE, Völlner F, Gerlach T, Driemel O. Stand der humanen dentalen Stammzellforschung. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 2007; 11(5):259–66.
43. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of endodontics* 2011; 37(11):1536–41.
44. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *Journal of endodontics* 2007; 33(6):703–8.
45. Li L, Zhu Y-Q, Jiang L, Peng W, Ritchie HH. Hypoxia promotes mineralization of human dental pulp cells. *Journal of endodontics* 2011; 37(6):799–802.
46. Huang GT-J, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *Journal of endodontics* 2006; 32(11):1066–73.
47. Kim SG, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M et al. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dental clinics of North America* 2012; 56(3):563–75.
48. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(25):13625–30.
49. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100(10):5807–12.
50. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics* 2008; 34(2):166–71.
51. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364:149–55.
52. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *Journal of dental research* 2008; 87(8):767–71.
53. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative medicine* 2010; 5(4):617–31.
54. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries research* 1995; 29(6):483–9.
55. Heidemann D, Becker J. *Kariologie und Füllungstherapie*. 4. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 1999.

56. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006; 27(14):2865–73.
57. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *Journal of dentistry* 2007; 35(8):636–42.
58. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. *The journal of adhesive dentistry* 2013; 15(5):407–12.
59. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Operative dentistry. Supplement* 1984; 3:13–29.
60. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endodontics & dental traumatology* 1990; 6(4):142–9.
61. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *Journal of endodontics* 1975; 1(7):238–42.
62. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1981; 52(2):197–204.
63. Olgart L, Brännström M, Johnson G. Invasion of bacteria into dentinal tubules. Experiments in vivo and in vitro. *Acta odontologica Scandinavica* 1974; 32(1):61–70.
64. Schulz H, Trautenhahn J. Wachstumsfaktoren. In: Lippert H, Assadian O. *Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2006. 83-87 .
65. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2008; 16(5):585–601.
66. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *Journal of endodontics* 2011; 37(1):26–30.
67. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2001; 12(5):425–37.
68. Schwenzer N, Bares R. *Chirurgische Grundlagen*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2008. (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde[1]).
69. Schliephake Henning. Wachstumsfaktoren. In: Schwenzer N, Bares R. *Chirurgische Grundlagen*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2008. 369–78 (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde; [1]).

70. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *Journal of endodontics* 2010; 36(12):1963–6.
71. Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ et al. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *Journal of dental research* 2011; 90(8):1013–8.
72. Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *The International journal of developmental biology* 1995; 39(1):281–90.
73. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biology International* 2008; 32(7):827–34.
74. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *Journal of dental research* 2000; 79(9):1689–96.
75. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC-C, Botero TM, Holland GR et al. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *Journal of dental research* 2008; 87(12):1144–8.
76. Kalyva M, Papadimitriou S, Tziafas D. Transdentinal stimulation of tertiary dentine formation and intratubular mineralization by growth factors. *International Endodontic Journal* 2010; 43(5):382–92.
77. Chun SY, Lee HJ, Choi YA, Kim KM, Baek SH, Park HS et al. Analysis of the soluble human tooth proteome and its ability to induce dentin/tooth regeneration. *Tissue engineering. Part A* 2011; 17(1-2):181–91.
78. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Archives of oral biology* 1999; 44(2):149–56.
79. Liang RF, Nishimura S, Sato S. Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on insulin-induced differentiation in rat dental pulp cells. *Archives of oral biology* 1992; 37(10):789–95.
80. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *Journal of cellular physiology* 1998; 174(2):194–205.
81. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *Journal of dental research* 1994; 73(9):1509–14.
82. Liang RF, Nishimura S, Maruyama S, Hanazawa S, Kitano S, Sato S. Effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells. *Archives of oral biology* 1990; 35(1):7–11.

83. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Archives of oral biology* 1992; 37(3):231–6.
84. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *Journal of endodontics* 2002; 28(1):20–3.
85. Derringer KA, Linden RWA. Vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 2, platelet derived growth factor and transforming growth factor beta released in human dental pulp following orthodontic force. *Archives of oral biology* 2004; 49(8):631–41.
86. Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H et al. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Developmental biology* 1995; 170(2):457–66.
87. Telles PDS, Hanks CT, Machado, M A A M, Nör JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *Journal of dental research* 2003; 82(6):466–70.
88. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *The American journal of pathology* 1999; 154(2):375–84.
89. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(13):9102–5.
90. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *Journal of dental research* 2010; 89(6):603–8.
91. Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue engineering. Part A* 2010; 16(10):3023–31.
92. Sauerbier S, Schmelzeisen R. Tissue Engineering. In: Schwenzer N, Bares R. *Chirurgische Grundlagen*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2008. 360-368 (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde; [1]).
93. Produktion von rekombinanten Proteinen (Wachstumsfaktoren) und Antikörpern. URL:http://www.bioprozesstechnik.uni-bayreuth.de/de/research/eeBioprozessentwicklung/aaProduktion_von_rekombinanten_Proteinen_und_Antikoerpern/index.html (letztmalig aufgerufen am 13.12.2016)
94. Böcker W, Denk H, Heitz P, Höfler G, Kreipe H, Moch H. *Pathologie*. 5. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012.

95. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of dental research* 2014; 93(4):335–45.
96. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000; 6(8):3147–52.
97. Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(28):3751–6.
98. Alley BS, Kitchens GG, Alley LW, Eleazer PD. A comparison of survival of teeth following endodontic treatment performed by general dentists or by specialists. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2004; 98(1):115–8.
99. Marending M, Peters OA, Zehnder M. Factors affecting the outcome of orthograde root canal therapy in a general dentistry hospital practice. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2005; 99(1):119–24.
100. Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K, Hara A, Nakata K, Morita I et al. Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps. A meta-analysis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2004; 97(1):95–9.
101. Dammaschke T, Steven D, Kaup M, Ott KHR. Long-term survival of root-canal-treated teeth: a retrospective study over 10 years. *Journal of endodontics* 2003; 29(10):638–43.
102. Siqueira JF, JR, Rocas IN, Ricucci D, Hulsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *British dental journal* 2014; 216(6):305–12.
103. Friedman S, Mor C. The success of endodontic therapy--healing and functionality. *Journal of the California Dental Association* 2004; 32(6):493–503.
104. Soares PV, Santos-Filho PCF, Queiroz EC, Araujo TC, Campos RE, Araujo CA et al. Fracture resistance and stress distribution in endodontically treated maxillary premolars restored with composite resin. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists* 2008; 17(2):114–9.
105. Andersson L. Epidemiology of traumatic dental injuries. *Journal of endodontics* 2013; 39(3):2–5.
106. Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endodontics & dental traumatology* 1992; 8(2):45–55.
107. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of endodontics* 2010; 36(3):400–13.

108. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* 2012; 28(1):25–32.
109. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues J-J. MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clinical oral investigations* 2015; 19(6):1381–8.
110. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontologisk revy* 1972; 23(1):27–44.
111. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AAR, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *Journal of endodontics* 2014; 40(2):192–8.
112. Mankani N, Chowdhary R, Patil BA, Nagaraj E, Madalli P. Osseointegrated dental implants in growing children: a literature review. *The Journal of oral implantology* 2014; 40(5):627–31.
113. Mohammadi Z. Strategies to manage permanent non-vital teeth with open apices: a clinical update. *International dental journal* 2011; 61(1):25–30.
114. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics* 2004; 30(4):196–200.
115. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *Journal of endodontics* 2010; 36(3):536–41.
116. Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, Teixeira FB, Vann William F Jr. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatric dentistry* 2012; 34(1):66–9.
117. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* 2001; 17(4):185–7.
118. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta odontologica Scandinavica* 1961; 19:324–53.
119. Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1978; 45(1):17–28.
120. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *Journal of endodontics* 2011; 37(2):133–8.
121. Kling M, Cvek M, Mejare I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endodontics & dental traumatology* 1986; 2(3):83–9.

122. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A way forward. *Journal of the American Dental Association* 2016; 147(5):372–80.
123. Krastl G, Allgayer N, Lenherr P, Filippi A, Taneja P, Weiger R. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a literature review. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* 2013; 29(1):2–7.
124. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *International Endodontic Journal* 2012; 45(10):942–9.
125. Alobaid AS, Cortes LM, Lo J, Nguyen TT, Albert J, Abu-Melha AS et al. Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. *Journal of endodontics* 2014; 40(8):1063–70.
126. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics* 2013; (28):2–23.
127. Weisleder R, Yamauchi S, Caplan DJ, Trope M, Teixeira FB. The validity of pulp testing: a clinical study. *Journal of the American Dental Association* 2009; 140(8):1013–7.
128. Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *Journal of endodontics* 2012; 38(10):1330–6.
129. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *Journal of endodontics* 2014; 40(1):133–9.
130. Simon SRJ, Tomson PL, Berdal A. Regenerative endodontics: regeneration or repair? *Journal of endodontics* 2014; 40(4):5.
131. Lin LM, Shimizu E, Gibbs JL, Loghin S, Ricucci D. Histologic and histobacteriologic observations of failed revascularization/revitalization therapy: a case report. *Journal of endodontics* 2014; 40(2):291–5.
132. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure (Revised 6-8-16) 2016. URL: https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf (letztmalig aufgerufen am 13.12.2016).
133. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicusps using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *International Endodontic Journal* 2009; 42(1):84–92.
134. Galler KM, Krastl G, Simon S, van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, Lambrechts P, Dummer PM. European Society of Endodontology Position Statement: Revitalisation Procedures. *International Endodontic Journal* 2016; 49(8):717–23.

135. Kindelan SA, Day PF, Kindelan JD, Spencer JR, Duggal MS. Dental trauma: an overview of its influence on the management of orthodontic treatment. Part 1. *Journal of orthodontics* 2008; 35(2):68–78.
136. Schmalz G, Galler KM. Tissue injury and pulp regeneration. *Journal of dental research* 2011; 90(7):828–9.
137. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one* 2006; 1:e79.
138. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research* 2002; 81(8):531–5.
139. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Archives of oral biology* 1992; 37(12):1045–55.
140. About I, Bottero MJ, Denato P de, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Experimental cell research* 2000; 258(1):33–41.
141. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller K-A, Hoffer PC et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal* 2015; 49(6):581–90.
142. Widbiller M, Eidt A, Hiller KA, Buchalla W, Schmalz G, Galler KM. Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. *Clinical oral investigations*: 2016 Apr 25 [Epub ahead of print].
143. Schäfer E. Die Therapie endodontischer Notfälle. Berlin [u.a.]: Quintessenz-Verl.-GmbH; 2008.
144. Bergenholz G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scandinavian journal of dental research* 1977; 85(2):122–9.
145. Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B, Edebo L. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. *Infection and immunity* 1991; 59(2):689–95.
146. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *Journal of endodontics* 1981; 7(1):31–5.
147. Suerbaum S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Auflage. Berlin: Springer; 2012.
148. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1998; 85(1):86–93.
149. Hecker H, Amato M, Weiger R. Die Wurzelkanalspülung. *Zahnmedizin up2date* 2007; 2(2):89–108.

150. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *International Endodontic Journal* 2001; 34(3):184–8.
151. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *International Endodontic Journal* 2000; 33(2):126–31.
152. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2005; 31(1):53–6.
153. Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *Journal of endodontics* 1982; 8(2):59–66.
154. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2004; 37(7):438–46.
155. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *Journal of endodontics* 2006; 32(5):434–7.
156. Lester KS, Boyde A. Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals. *British dental journal* 1977; 143(11):359–67.
157. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1971; 31(1):96–103.
158. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *Journal of endodontics* 1978; 4(2):60–4.
159. Rosenfeld EF, James GA, Burch BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *Journal of endodontics* 1978; 4(5):140–6.
160. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2001; 92(4):446–50.
161. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *Journal of endodontics* 2004; 30(12):880–2.
162. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *International Endodontic Journal* 2001; 34(2):120–32.
163. Barbosa SV, Safavi KE, Spångberg SW. Influence of sodium hypochlorite on the permeability and structure of cervical human dentine. *International Endodontic Journal* 1994; 27(6):309–12.

164. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1973; 36(6):856–71.
165. Gutmann JL. Adaptation of injected thermoplasticized gutta-percha in the absence of the dentinal smear layer. *International Endodontic Journal* 1993; 26(2):87–92.
166. Zehnder M. Root canal irrigants. *Journal of endodontics* 2006; 32(5):389–98.
167. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endodontics & dental traumatology* 1993; 9(6):243–8.
168. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scandinavian journal of dental research* 1977; 85(4):255–65.
169. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *Journal of endodontics* 2002; 28(2):68–71.
170. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *International Endodontic Journal* 1999; 32(2):99–102.
171. Rolla G, Loe H, Schiott CR. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Archives of oral biology* 1971; 16(9):1109–16.
172. Emilson CG, Ericson T, Heyden G, Magnusson BC. Uptake of chlorhexidine to hydroxyapatite. *Journal of periodontal research. Supplement* 1973; 12:17–21.
173. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *Journal of endodontics* 1997; 23(4):229–31.
174. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *Journal of endodontics* 2000; 26(6):315–7.
175. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal* 2003; 36(2):75–85.
176. Wennberg A. Biological evaluation of root canal antiseptics using in vitro and in vivo methods. *Scandinavian journal of dental research* 1980; 88(1):46–52.
177. Santos JN, Carrilho, Marcela Rocha de Oliveira, Goes MF de, Zaia AA, Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, Souza-Filho FJd et al. Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. *Journal of endodontics* 2006; 32(11):1088–90.
178. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *Journal of endodontics* 2004; 30(11):792–5.

179. Patterson SS. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1963; 16:83–103.
180. Pawlicka H. Verwendung der Chelatverbindungen zur Erweiterung der Wurzelkanäle. *Mikrohärteuntersuchungen. Stomatologie der DDR* 1982; 32(5):355–61.
181. Cohen S, Stewart GG, Laster LL. The effects of acids, alkalies, and chelating agents on dentine permeability. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1970; 29(4):631–4.
182. Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, Borke J et al. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *Journal of endodontics* 2012; 38(1):62–5.
183. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 2010; 26(11):1059–67.
184. Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *Journal of endodontics* 1999; 25(1):21–3.
185. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Özçelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *Journal of oral science* 2001; 43(4):233–8.
186. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *Journal of endodontics* 1996; 22(7):337–40.
187. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *Journal of endodontics* 1997; 23(4):205–8.
188. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *European journal of oral sciences* 2006; 114(2):160–6.
189. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *Journal of endodontics* 2006; 32(9):862–8.
190. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *International Endodontic Journal* 2003; 36(6):411–7.
191. Grande NM, Plotino G, Falanga A, Pomponi M, Somma F. Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: a nuclear magnetic resonance analysis. *Journal of endodontics* 2006; 32(5):460–4.

192. Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. *Journal of endodontics* 1996; 22(1):27–9.
193. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *Journal of endodontics* 2005; 31(10):746–8.
194. Machado-Silveiro LF, González-López S, González-Rodríguez MP. Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. *International Endodontic Journal* 2004; 37(6):365–9.
195. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2003; 96(5):608–13.
196. Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. *Journal of endodontics* 2008; 34(11):1360–3.
197. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Journal of endodontics* 1994; 20(3):127–9.
198. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *International Endodontic Journal* 1997; 30(3):155–9.
199. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endodontics & dental traumatology* 1993; 9(6):249–53.
200. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *Journal of endodontics* 1988; 14(3):125–7.
201. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal* 1999; 32(5):361–9.
202. Segura JJ, Llamas R, Rubio-Manzanares AJ, Jimenez-Planas A, Guerrero JM, Calvo JR. Calcium hydroxide inhibits substrate adherence capacity of macrophages. *Journal of endodontics* 1997; 23(7):444–7.
203. Murray PE, Kitasako Y, Tagami J, Windsor LJ, Smith AJ. Hierarchy of variables correlated to odontoblast-like cell numbers following pulp capping. *Journal of dentistry* 2002; 30(7-8):297–304.
204. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries research* 2004; 38(3):314–20.
205. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of endodontics* 2012; 38(10):1372–5.

206. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* 2002; 18(3):134–7.
207. Ehrmann EH. The effect of triamcinolone with tetracycline on the dental pulp and apical periodontium. *The Journal of prosthetic dentistry* 1965; 15:144–52.
208. Bryson EC, Levin L, Banchs F, Abbott PV, Trope M. Effect of immediate intracanal placement of Ledermix Paste(R) on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* 2002; 18(6):316–21.
209. Ledermix Paste 2014. URL:<http://www.pharmazie.com/graphic/A/56/0-12356.pdf> (letztmalig aufgerufen am 13.12.2016).
210. Ehrmann EH, Messer HH, Adams GG. The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics. *International Endodontic Journal* 2003; 36(12):868–75.
211. Negm MM. Intracanal use of a corticosteroid-antibiotic compound for the management of posttreatment endodontic pain. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2001; 92(4):435–9.
212. Jetty KR, Sidebottom A. Informing the patient. *Br Dent J* 2013; 214(12):607.
213. Cruz EV, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *International Endodontic Journal* 2002; 35(4):330–6.
214. Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *Journal of endodontics* 2005; 31(6):439–43.
215. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *International Endodontic Journal* 2004; 37(2):132–8.
216. Taneja S, Kumari M. Use of triple antibiotic paste in the treatment of large periradicular lesions. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2012; 3(1):72–6.
217. Kim J-H, Kim Y, Shin S-J, Park J-W, Jung I-Y. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *Journal of endodontics* 2010; 36(6):1086–91.
218. Jang JW, Bae Y-J, Kim YG, Jin Y-J, Park KS, Cho YS et al. A case of anaphylaxis to oral minocycline. *Journal of Korean medical science* 2010; 25(8):1231–3.
219. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of endodontics* 2007; 33(6):680–9.

220. Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *International Endodontic Journal* 2013; 46(7):688–95.
221. Chlorhexamed 1%-Gel zur Anwendung in der Mundhöhle 2016. URL:<http://www.pharmazie.com/graphic/A/92/1-26692.pdf> (letztmalig aufgerufen am 13.12.2016).
222. Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2006; 102(2):31.
223. Quantikine ELISA Human TGF- β 1 Immunoassay 2006. URL:<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/db100b.pdf> (letztmalig aufgerufen am 13.12.2016)
224. Miller RG. Simultaneous statistical interference. New York: McGraw-Hill; 1981.
225. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal of endodontics* 2016; 42(1):47–56.
226. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *Journal of endodontics* 2015; 41(3):363–8.
227. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *Journal of endodontics* 1984; 10(8):359–63.
228. Chrepa V, Henry MA, Daniel BJ, Diogenes A. Delivery of Apical Mesenchymal Stem Cells into Root Canals of Mature Teeth. *Journal of dental research* 2015; 94(12):1653–9.
229. Pang N-S, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W et al. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *Journal of endodontics* 2014; 40(6):811–7.
230. Verdelis K, Eliades G, Oviir T, Margelos J. Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle and apical root dentin locations. *Endodontics & dental traumatology* 1999; 15(4):164–70.
231. Heino J, Kämpylä J. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Current pharmaceutical design* 2009; 15(12):1309–17.
232. Marschall Z von, Fisher LW. Dentin matrix protein-1 isoforms promote differential cell attachment and migration. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283(47):32730–40.
233. Song JS, Wlodarska A, Ko HJ, Grzesik WJ. Targeting and immobilization of bioactive peptides on dentin matrix. *Journal of dental research* 2007; 86(10):968–73.

234. Ballal NV, Kundabala M, Bhat S, Rao N, Rao BSS. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009; 108(4):633–8.
235. Scea MF, Daniel RL, Santos EM, Jaeger MM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *Journal of endodontics* 2001; 27(12):741–3.
236. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *Journal of endodontics* 2014; 40(4):41–5.
237. Mozo S, Llena C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal* 2012; 17(3):6.
238. Lumley PJ, Walmsley AD, Laird WR. Streaming patterns produced around endosonic files. *International Endodontic Journal* 1991; 24(6):290–7.
239. Ahmad M, Pitt Ford TJ, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. *Journal of endodontics* 1987; 13(10):490–9.
240. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151):313–7.
241. Ding RY, Cheung GS-p, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Journal of endodontics* 2009; 35(5):745–9.
242. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of endodontics* 2000; 26(6):331–4.
243. Martin DE, De Almeida, Jose Flavio A, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of endodontics* 2014; 40(1):51–5.
244. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-part I: stem cell sources. *Journal of prosthodontic research* 2012; 56(3):151–65.
245. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of endodontics* 2014; 40(4):52–7.
246. Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MCS, Felipe WT, Pashley DH, Bortoluzzi EA. Effect of Ultrasonic Activation of Irrigants on Smear Layer Removal. *Journal of endodontics* 2015; 41(8):1359–63.
247. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *International Endodontic Journal* 2002; 35(11):934–9.

248. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *Journal of endodontics* 2011; 37(8):1109–15.
249. Huang GTJ. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative medicine* 2009; 4(5):697–707.
250. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: A case report. *International Endodontic Journal* 2009; 42(12):1118–26.
251. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *Journal of endodontics* 2008; 34(12):1474–9.
252. Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *Journal of endodontics* 2014; 40(8):1172–7.
253. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative Treatment of an Immature, Traumatized Tooth With Apical Periodontitis: Report of a Case. *Journal of endodontics* 2008; 34(5):611–6.
254. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *Journal of endodontics* 2011; 37(9):1327–30.
255. Chen MY-H, Chen K-L, Chen C-A, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *International Endodontic Journal* 2012; 45(3):294–305.
256. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of endodontics* 2014; 40(4):521–5.
257. Zhang K, Kim YK, Cadenaro M, Bryan TE, Sidow SJ, Loushine RJ et al. Effects of different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. *Journal of endodontics* 2010; 36(1):105–9.
258. Yassen GH, Chu T-MG, Eckert G, Platt JA. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. *Journal of endodontics* 2013; 39(2):269–73.
259. Minabe M, Takeuchi K, Kumada H, Umemoto T. The effect of root conditioning with minocycline HCl in removing endotoxin from the roots of periodontally-involved teeth. *Journal of periodontology* 1994; 65(5):387–92.
260. Zhang K, Tay FR, Kim YK, Mitchell JK, Kim JR, Carrilho M et al. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the

erosion of instrumented radicular dentin. Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials 2010; 26(6):514–23.

261. Hu X, Peng Y, Sum C-P, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteinization: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. Journal of endodontics 2010; 36(12):2008–11.
262. Sabrah AHA, Yassen GH, Gregory RL. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. Journal of endodontics 2013; 39(11):1385–9.

9 Anhang

Signifikanztabellen

Die folgenden Signifikanztabellen stellen die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels nichtparametrischer Mann-Whitney-Tests mit einer Anpassung des Signifikanzniveaus ($\alpha=0,05$) zur Fehlerkorrektur dar. Die Zahlen geben die Signifikanzwerte (p-Werte) an ($p \leq 0,05$), „n.s.“ bedeutet nicht signifikant ($p > 0,05$). In den Versuchen 2 und 3 wurde eine Konditionierung des Dentins mit EDTA pH 7 und 0,268 mol/L (10%) aus Versuch 1 als Referenzwert angenommen.

Versuch 1

	05:10	05:20	10:20
EDTA pH 6; 0,268 mol/L (10%)	n.s.	n.s.	n.s.
EDTA pH 7; 0,268 mol/L (10%)	n.s.	0,010	n.s.
EDTA pH 7; 0,456 mol/L (17%)	0,008	0,000	n.s.
Zitronensäure pH 2; 0,476 mol/L (10%)	n.s.	n.s.	n.s.
Zitratpuffer pH 5	n.s.	n.s.	n.s.
Zitronensäurephosphatpuffer pH 7	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 4: Signifikanzauswertung für verschiedene Einwirkzeiten von demineralisierenden Spüllösungen von 5, 10 und 20 Minuten gegeneinander

	EDTA pH 6 0,268 mol/L	EDTA pH 7 0,456 mol/L	Zitronensäure pH 2 (10%) 0,476 mol/L	Zitratpuffer pH 5	Zitronensäure- phosphatpuffer pH 7
EDTA pH 7 0,268 mol/L	n.s.	0,016	0,000	0,000	0,000

Tabelle 5: Signifikanzauswertung für EDTA pH 7 und 0,268 mol/L (10%) gegenüber anderen demineralisierenden Lösungen bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten

	EDTA pH 6 0,268 mol/L	EDTA pH 7 0,456 mol/L	Zitronensäure pH 2 (10%) 0,476 mol/L	Zitratpuffer pH 5	Zitronensäure- phosphatpuffer pH 7
EDTA pH 7 0,268 mol/L	n.s.	n.s.	0,000	0,000	0,000

Tabelle 6: Signifikanzauswertung für EDTA pH 7 und 0,268 mol/L (10%) gegenüber anderen demineralisierenden Lösungen bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten

	EDTA pH 6 0,268 mol/L	EDTA pH 7 0,456 mol/L	Zitronensäure pH 2 (10%) 0,476 mol/L	Zitratpuffer pH 5	Zitronensäure- phosphatpuffer pH 7
EDTA pH 7 0,268 mol/L	0,021	n.s.	0,000	0,000	0,000

Tabelle 7: Signifikanzauswertung für EDTA pH 7 und 0,268 mol/L (10%) gegenüber anderen demineralisierenden Lösungen bei einer Einwirkzeit von 20 Minuten

Die Signifikanzauswertung von EDTA pH 6 0,268 mol/L (10%) gegenüber EDTA pH 7 0,456 mol/L (17%) zeigte bei einer Einwirkzeit von 20 Minuten einen signifikanten Unterschied. Gegenüber Zitronensäure und deren Derivate konnten stets signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Versuch 2

	5 min	10 min	20 min
CHX 5 min	n.s.	n.s.	0,027
CHX 10 min	n.s.	n.s.	n.s.
NaOCl 5 min	0,001	n.s.	n.s.
NaOCl 10 min	0,000	0,033	0,033

Tabelle 8: Signifikanzauswertung für eine Dentinvorbehandlung mit desinfizierenden Spüllösungen gegenüber dem Referenzwert (keine Vorbehandlung) bei gleicher Einwirkzeit

	05:10	05:20	10:20
CHX 5 min	0,002	0,012	0,024
CHX 10 min	0,040	0,002	n.s.
NaOCl 5 min	0,028	0,000	0,009
NaOCl 10 min	0,000	0,000	n.s.

Tabelle 9: Signifikanzauswertung für verschiedene Einwirkzeiten einer Dentinvorbehandlung mit einer desinfizierenden Spüllösung von 5, 10 und 20 Minuten gegeneinander

	CHX 5 min	CHX 10 min	NaOCl 5 min
CHX 10 min	n.s.		
NaOCl 5 min	0,016	0,000	
NaOCl 10 min	0,000	0,000	0,038

Tabelle 10: Signifikanzauswertung für eine Dentinvorbehandlung mit verschiedenen desinfizierenden Spüllösungen bei gleicher Einwirkzeit von 5 Minuten gegeneinander

	CHX 5 min	CHX 10 min	NaOCl 5 min
CHX 10 min	n.s.		
NaOCl 5 min	0,002	0,001	
NaOCl 10 min	0,000	0,000	n.s.

Tabelle 11: Signifikanzauswertung für eine Dentinvorbehandlung mit verschiedenen desinfizierenden Spüllösungen bei gleicher Einwirkzeit von 10 Minuten gegeneinander

	CHX 5 min	CHX 10 min	NaOCl 5 min
CHX 10 min	n.s.		
NaOCl 5 min	0,012	0,012	
NaOCl 10 min	0,003	0,009	n.s.

Tabelle 12: Signifikanzauswertung für eine Dentinvorbehandlung mit verschiedenen desinfizierenden Spüllösungen bei gleicher Einwirkzeit von 20 Minuten gegeneinander

Versuch 3

	5 min	10 min	20 min
Ledermix	n.s.	n.s.	n.s.
Kalziumhydroxid, wasserbasiert	n.s.	n.s.	n.s.
Kalziumhydroxid, ölbasiert	0,029	n.s.	n.s.
Triple-Antibiotika-Paste	n.s.	n.s.	n.s.
CHX-Gel	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 13: Signifikanzauswertung für eine Dentinvorbehandlung mit Medikamenten gegenüber dem Referenzwert (keine Vorbehandlung) bei gleicher Einwirkzeit

	05:10	05:20	10:20
Ledermix	n.s.	n.s.	n.s.
Kalziumhydroxid, wasserbasiert	n.s.	0,015	n.s.
Kalziumhydroxid, ölbasiert	0,009	0,004	n.s.
Triple-Antibiotika-Paste	n.s.	n.s.	n.s.
CHX-Gel	0,002	n.s.	n.s.

Tabelle 14: Signifikanzauswertung für verschiedene Einwirkzeiten einer Dentinvorbehandlung mit einem Medikament von 5, 10 und 20 Minuten gegeneinander

	Ledermix	Kalziumhydroxid ölbasiert	Triple- Antibiotika-Paste	CHX-Gel
Kalziumhydroxid wasserbasiert	0,026	0,004	0,015	0,002

Tabelle 15: Signifikanzauswertung für Kalziumhydroxid wasserbasiert gegenüber anderen Medikamenten bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten

	Ledermix	Kalziumhydroxid ölbasiert	Triple- Antibiotika-Paste	CHX-Gel
Kalziumhydroxid wasserbasiert	n.s.	n.s.	0,026	n.s.

Tabelle 16: Signifikanzauswertung für Kalziumhydroxid wasserbasiert gegenüber anderen Medikamenten bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten

	Ledermix	Kalziumhydroxid ölbasiert	Triple- Antibiotika-Paste	CHX-Gel
Kalziumhydroxid wasserbasiert	n.s.	0,009	n.s.	0,045

Tabelle 17: Signifikanzauswertung für Kalziumhydroxid wasserbasiert gegenüber anderen Medikamenten bei einer Einwirkzeit von 20 Minuten

Es wurden auch die übrigen Medikamente bei gleicher Einwirkzeit gegeneinander getestet, jedoch konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AAE	American Association of Endodontists
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
Ca(OH) ₂	Kalziumhydroxid
CHX	Chlorhexidin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAP	Double-Antibiotika-Paste
DFSC	Dentale Follikelstammzellen
DMP	Dentin Matrix Protein
DPSC	Dentale Pulpa-Stammzellen
DSPP	Dentin Sialophosphoprotein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESE	European Society of Endodontology
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
IGF	Insulin-like Growth Factor
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mol	Stoffmengeneinheit
MTA	Mineraltrioxidaggregat
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit

NaOH	Natriumhydroxid
NCP	Nicht-kollagene Proteine
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDLSC	Stammzellen des parodontalen Ligaments
pg	Pikogramm
PIGF	Placenta Growth Factor
PRP	Thrombozytenreiches Plasma
REP	Regenerativ Endodontic Procedures
SCAP	Stammzellen der dentalen apikalen Papille
SHED	Stammzellen aus humanen Milchzähnen
TAP	Triple-Antibiotika-Paste
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Kerstin Galler für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Versuche bedanken. Zudem weiß ich Ihr Vertrauen und Ihre Förderung sehr zu schätzen und möchte mich daher besonders für die Möglichkeiten bedanken, durch welche ich tiefere Einblicke in die Forschung erhalten habe und meinen Horizont neben dem Studium erweitern konnte.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Dr. Karl-Anton Hiller für die schnelle und freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Einen weiteren ganz besonderen Dank möchte ich Andi Eidt für seine außerordentlich gute Betreuung aussprechen. Ganz selbstverständlich und professionell, sowie stets mit Humor wurde ich in die Laborarbeiten eingewiesen, jederzeit unterstützt und dadurch sind gebrochene Knochen schnell vergessen worden.

Ich möchte mich auch nochmals bei Herrn Prof. Dr. Gottfried Schmalz für die tatkräftige Unterstützung sowie freundliche Begleitung auf den Frankfurter Zahnärztetag 2014 bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner wundervollen Familie danken. Danke, dass ihr mir zu jedem Zeitpunkt und in allen Lebensbereichen mit passenden Lebensweisheiten unterstützend zur Seite steht und mich stets motiviert und fördert, insbesondere meinem Vorbild: mein Bruder Frank.